UNTERSUCHUNG ÜBER DEN EINFLUSS VON 2, 3, 5, 6 – TETRACHLORANILIN UND 2 – METHOXY – ÄTHANOL AUF DIE AUGENLINSE SOWIE VON 2 – METHOXYÄTHANOL AUF ZAHNBILDUNG UND CALCIUMHAUSHALT VON RATTEN

INAUGURAL–DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von

ERWIN JOSTEN

aus Mayschoß

BONN 1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546506_0031

UNTERSUCHUNG ÜBER DEN EINFLUSS VON 2, 3, 5, 6 – TETRACHLORANILIN UND 2 – METHOXY – ÄTHANOL AUF DIE AUGENLINSE SOWIE VON 2 – METHOXYÄTHANOL AUF ZAHNBILDUNG UND CALCIUMHAUSHALT VON RATTEN

INAUGURAL–DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von

ERWIN JOSTEN

aus Mayschoß

BONN 1980

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. H.R. Koch

2. Gutachter: Prof. Dr. N. Liappis

Aus dem Klinischen Institut für Experimentelle Ophthalmologie
der Universität Bonn
Abteilung für Biochemie des Auges
Leiter: Prof. Dr. O. Hockwin

Druck: Dissertationsdruck M. Wehle, Hauptstr. 240
5305 Witterschlick; Tel. 0228/641113

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Meiner Frau Ruth

INHALTSVERZEICHNIS

1 Problemstellung

2 Über den Einfluß von 2,3,5,6-Tetrachloranilin auf die Augenlinsen von Ratten

2.1 Einführung
2.1.1 Einfluß von Umweltchemikalien auf die Linse
2.1.2 2,3,5,6-Tetrachloranilin
2.1.2.1 Physiko-chemische Eigenschaften
2.1.2.2 Synthese
2.1.2.3 Verwendung
2.1.2.4 Stoffwechsel
2.1.2.5 Toxikologie
2.2 Material und Methoden
2.2.1 Versuchstiere und Tierhaltung
2.2.2 Versuchsaufbau
2.2.3 Lösungsmittel
2.2.4 Herstellung der Lösungen und Dosierung
2.2.4.1 Orale Applikation
2.2.4.2 Lokale Applikation
2.2.5 Voruntersuchung
2.2.6 Versuchsdurchführung
2.2.6.1 Spaltlampenuntersuchung
2.2.6.2 Linsenpräparation und Linsengewichte
2.2.6.3 Körpergewichte
2.2.6.4 Histologische Untersuchung der Milzen
2.3 Ergebnisse
2.3.1 Spaltlampenbefunde
2.3.2 Linsengewichte
2.3.3 Körpergewichte
2.3.4 Histologische Untersuchung der Milzen
2.4 Diskussion
2.4.1 Wirkung auf die Linse
2.4.2 Wirkung auf das Körpergewicht
2.4.3 Wirkung auf die Milz

3 Über den Einfluß von 2 - Methoxyäthanol auf die Augenlinsen sowie auf Zahnbildung und Calciumhaushalt von Ratten

3.1 Einführung

3.1.1 2-Methoxyäthanol

3.1.1.1 Physiko-chemische Eigenschaften

3.1.1.2 Synthese

3.1.1.3 Verwendung

3.1.1.4 Toxikologie

3.1.2 Tween-80

3.1.2.1 Physiko-chemische Eigenschaften

3.1.2.2 Synthese

3.1.2.3 Verwendung

3.1.2.4 Stoffwechsel und Ausscheidung

3.1.2.5 Toxikologie

3.1.3 Calciumhaushalt der Ratte

3.1.3.1 Gesamtcalciumhaushalt

3.1.3.2 Calciumaufnahme und Calciumstoffwechsel

3.1.3.3 Calcium im Blut

3.1.3.4 Calcium im Skelett

3.1.3.5 Calciumgehalt der Nagezähne und der Knochen

3.1.3.6 Regulation des Calciumstoffwechsels

3.1.4 Biochemie der Verkalkung

3.1.4.1 Theorien mit vorwiegend nicht enzymatischem Charakter

3.1.4.2 Theorien mit vorwiegend enzymatischem Charakter

3.1.5 Nagezähne der Ratte

3.1.5.1 Schmelz

3.1.5.2 Dentin

3.1.5.3 Zement

3.1.6 Veränderungen der Zahnhartsubstanzen

3.1.6.1 Veränderungen ausgewachsener Zähne

3.1.6.2 Veränderungen wachsender Zähne

3.1.6.3 Wirkungsmechanismen

3.2 Material und Methoden
3.2.1 Versuchstiere und Tierhaltung
3.2.2 Versuchsaufbau und Dosierung
3.2.3 Herstellung der Lösungen
3.2.4 Voruntersuchung
3.2.5 Versuchsdurchführung
3.2.5.1 Körpergewichte
3.2.5.2 Klinische Untersuchung der Nagezähne
3.2.5.3 Röntgenuntersuchung der Nagezähne
3.2.5.4 Calciumbestimmungen bei Nagezähnen, Femur und Serum
3.2.5.5 Herstellung der histologischen Präparate
3.3 Ergebnisse
3.3.1 Körpergewichte
3.3.2 Klinische Untersuchung der Nagezähne
3.3.3 Röntgenuntersuchung der Nagezähne
3.3.4 Histologische Untersuchung der Nagezähne
3.3.5 Calciumgehalt von Nagezähnen, Femur und Serum
3.4 Diskussion
3.4.1 Klinische Untersuchung
3.4.2 Histologische Untersuchung
3.4.3 Calciumbestimmungen
3.4.4 Wirkung von Tween-80
3.4.5 Schlußbetrachtung

4 Zusammenfassung

5 Literaturverzeichnis

Verzeichnis der benutzten Abkürzungen

1 Problemstellung

Immer größer wird die Zahl der Stoffe, die unsere Umwelt belasten. Im Zuge eines ständig steigenden Umweltbewußtseins und durch zahlreiche vermeidbare Zwischenfälle gewarnt, ist es für die Wissenschaft unerläßlich,neben dem für den jeweiligen Anwendungsbereich erwünschten Nutzeffekt einer Chemikalie gleichfalls deren Nebenwirkungen zu studieren. Seit einiger Zeit wird im Institut für experimentelle Ophthalmologie an der Universität Bonn unter der Leitung von Prof. Dr. Hockwin die Wirkung von Umweltchemikalien auf das Auge untersucht.
Es ist seit längerem bekannt, daß es unter der Einwirkung von Pestiziden zu Veränderungen am menschlichen Auge kommen kann. Als Herbizide werden auch chlorierte Aniline eingesetzt. Es sollte daher im Tierexperiment überprüft werden, ob das in die Gruppe der chlorierten Aniline gehörende 2,3,5,6-Tetrachloranilin eine kataraktogene Wirkung hat.
Parallel zu diesem Versuch wurden im Rahmen dreier weiterer Dissertationen Untersuchungen mit Mono- (KIRCHHOFF, 1980), Di- (STUTZ, 1980) und Trichloranilin (KÖSTER, 1980) durchgeführt.
Wie im ersten Abschnitt dieser Dissertation gezeigt werden wird, stellte sich im Verlauf dieser Untersuchung heraus, daß schon das für die Applikation der chlorierten Aniline verwendete Lösungsmittel Linsentrübungen hervorruft. Dabei ließ sich nachweisen, daß 2-Methoxyäthanol der kataraktogene Bestandteil des Lösungsmittelgemisches war. Über die Besonderheiten der durch 2-Methoxyäthanol hervorgerufenen Katarakt wird in den Dissertationen von KIRCHHOFF, KÖSTER und STUTZ im einzelnen berichtet.
Parallel zu den toxischen Erscheinungen an der Augenlinse kam es unter der Anwendung von 2-Methoxyäthanol zu charakteristischen Zahnveränderungen. Es sollte daher im zweiten Teil der vorliegenden Dissertation versucht werden, die beobachteten Zahnstörungen genau zu analysieren. Durch biochemische Untersuchungen des Serum sowie der Knochen- und Zahnhartsubstanzen sollte geprüft werden, ob eine Störung des Calciumhaushalts als Ursache der beobachteten Augenlinsen- und Zahnveränderungen in Betracht kommt.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden für die beiden Teilabschnitte insgesamt fünf Tierversuche durchgeführt. Zum besseren Verständnis des Versuchsaufbaus bei der Lektüre der folgenden Arbeit ist auf Abbildung 1 eine Übersicht über Dauer, Gruppenzusammensetzung und Behandlung dargestellt. Dabei wurden die einzelnen Versuche mit römischen, die Versuchsgruppen mit arabischen Ziffern numeriert.

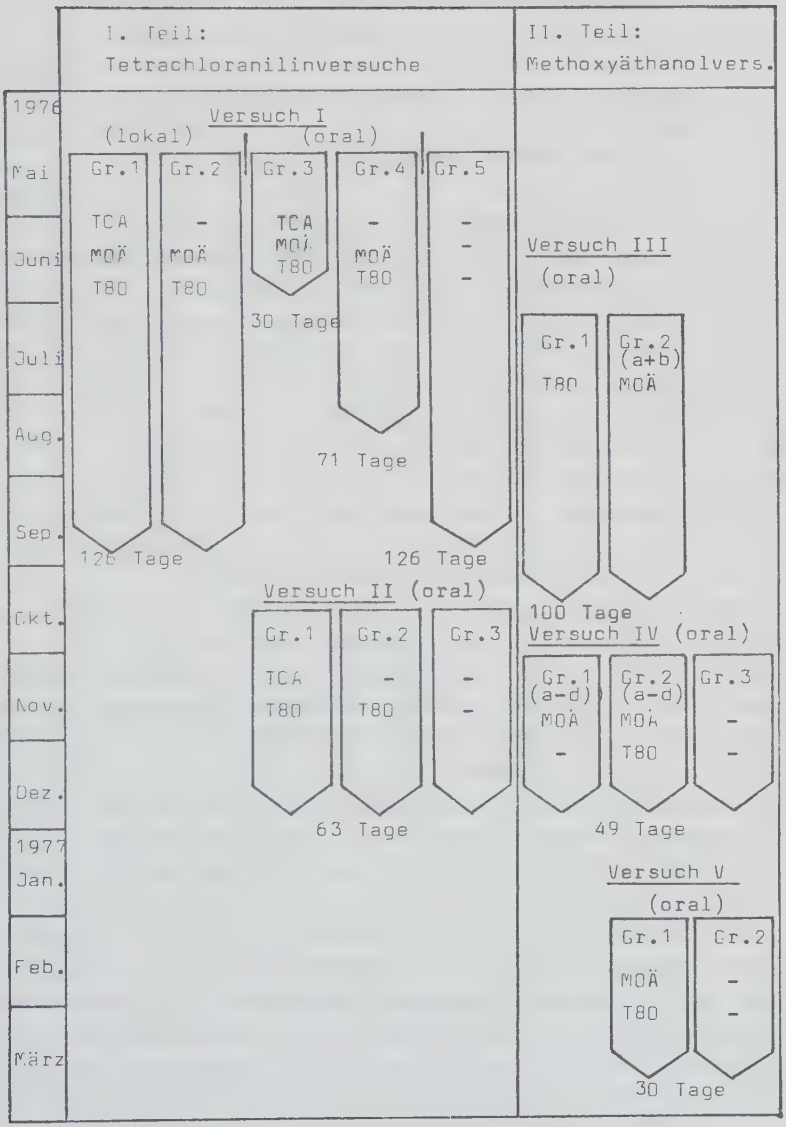


Abb. 1: Übersicht über die 5 im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche.

2 Über den Einfluß von 2,3,5,6-Tetrachloranilin auf die Augenlinsen von Ratten

2.1 Einführung

2.1.1 Einfluß von Umweltchemikalien auf die Augenlinse

Vor 40 Jahren wurde erstmals in der Literatur ein Fall beschrieben, in dem als Umweltgifte zu bezeichnende Chemikalien Katarakte hervorriefen: Die Dämpfe von Paradichlorbenzol, ein Insektizid, das als Mottenschutzmittel und Deodorant eingesetzt wurde, führten bei zwei Frauen zu diskreten Linsentrübungen (BERLINER, 1939) . Im Tierexperiment gelang mit weiteren Herbiziden und Fungiziden wie 2,6-Dichlor-4-Nitroanilin (BERNSTEIN, 1970) und Amizol (3-Amino-1-H-1,2,4-Triazol; BHUYAN et al, 1973) die Erzeugung von Katarakten. Des weiteren sind Medikamente, wie zum Beispiel der Cholinesterasehemmer Echothiophatjodid, als kataraktogene Noxen bekannt. Dieses Mittel zur Behandlung von Glaukomerkrankungen wird auch als Pestizid verwandt (PIETSCH, 1972).
Im Rahmen der Risikoabschätzung wurde am Klinischen Institut für experimentelle Ophthalmologie an der Universität Bonn auch geprüft, ob chlorierte Kohlenwasserstoffe linsenschädigend wirken können. Diese finden als Pestizide weltweit Verwendung wie zum Beispiel Aldrin, Dieldrin, Monolinuron oder Buturon.
ISMAIL et al (1976) konnte bei in-vitro-Versuchen mit chlorierten Anilinen und Phenolen nachweisen, daß diese Substanzen die Linsenkapsel permeieren, wenn auch in unterschiedlicher Geschwindigkeit. Die Durchtrittsrate ist dabei abhängig von der Anzahl der am aromatischen Ring substituierten Chloratome: Je größer die Zahl der Chloratome, desto geringer die Penetrationsgeschwindigkeit. Weiterhin zeigten die Untersuchungen von ISMAIL et al, daß an der isolierten Linsenkapsel anhängende Eiweißreste durch 3,4-Dichlorphenol und 2,4,5-Trichlorphenol ausgefällt und damit trübe wurden. Anschließende Versuche mit Linsenhomogenatlösungen bestätigten die Präzipitation, wobei α-Kristallin in jedem Fall beteiligt war. Da durch weitere Vorarbeiten der Abteilung Biochemie des Auges an der Universität Bonn nachgewiesen werden

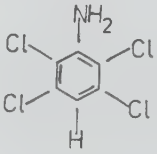
konnte, daß chlorierte Aniline durch die Hornhaut ins Kammerwasser gelangen und da ähnlich strukturierte Substanzen sich als kataraktogen erwiesen hatten, erschien es wünschenswert zu prüfen, ob solche chlorierten Anilinderivate bei einer lokalen oder systemischen Applikation zur Entwicklung von Linsentrübungen führen können. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich in diesem Zusammenhang mit der Wirkung von 2,3,5,6-Tetrachloranilin. Parallel zu dieser Untersuchung wurden Arbeiten zur Wirkung dreier anderer chlorierten Anilinderivate durchgeführt: 3-Monochloranilin (Dissertation KIRCHHOFF, 1980), 3,4-Dichloranilin (Dissertation STUTZ, 1980), 2,3,5-Trichloranilin (Dissertation KÖSTER, 1980).

2.1.2 2,3,5,6-Tetrachloranilin

Weitere chemisch exakte Bezeichnungen für 2,3,5,6-Tetrachloranilin sind auch: 2,3,5,6-Tetrachloraminobenzol
1-Amino-2,3,5,6-Tetrachlorbenzol

Summenformel: $C_6H_3Cl_4N$

Strukturformel:



Konsistenz: Kristallnadeln von blaßgrauer Farbe mit leicht süßlichem Geruch

2.1.2.1 Physiko-chemische Eigenschaften

Molekulargewicht: 230,91
Schmelzpunkt: 108°C
Löslichkeitsverhalten: 1. sehr leicht löslich in Äther und Ligroin
2. löslich in Alkoholen
3. in Wasser unlöslich

2,3,5,6-Tetrachloranilin ist eine sehr schwache Base (vgl. BEILSTEIN, 1950 und WEAST, 1970).

2.1.2.2 Synthese

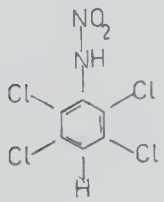
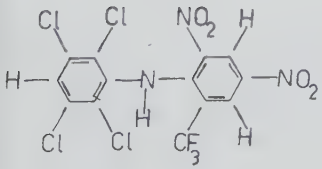
Eine Lösung von 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol in warmer rauchender Salpetersäure wird in Wasser gegeben. Das orangefarbige Produkt, welches Tetrachlorbenzochinon enthält, wird gesammelt und mit kochendem leichten Petroleum extrahiert. Der Extrakt wird auf dem Dampfbad eingedampft. Nach dem Umkristallisieren aus Ethanol wird Tetrachlornitrobenzol in blassen gelben Nadeln erhalten. Die Reduktion mit Zinn und Salzsäure ergibt 2,3,5,6-Tetrachloranilin (HOLLEMAN, 1926).

2.1.2.3 Verwendung

2,3,5,6-Tetrachloranilin kann eingesetzt werden zum Schutz von Nutzpflanzen gegen die Wirkung von bestimmten Herbiziden. Phenylamine oder deren Salze (also unter anderem auch 2,3,5,6-Tetrachloranilin) können, wenn sie im Boden angewendet werden, Nutzpflanzen wie zum Beispiel Reis vor den giftigen Effekten von Thiolcarbamatherbiziden schützen. Bei einer Zugabe von 2,3,5,6-Tetrachloranilin zu S-(4-chlorbenzyl)-diäthyldithiocarbamat in ein geflutetes Reisfeld konnte "Barnyard grass" unter völliger Kontrolle gehalten werden, während die Wuchshöhe der Reispflanzen nur leicht vermindert war (TAKEMATSU et al, 1976). Des weiteren tritt 2,3,5,6-Tetrachloranilin auch als Zwischenprodukt bei der Herstellung von bestimmten Pestiziden auf.

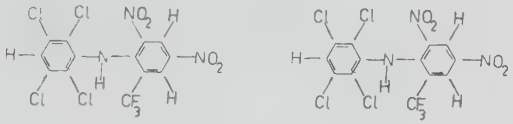
2.1.2.4 Stoffwechsel

Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt gesagt, tritt 2,3,5,6-Tetrachloranilin in der Regel nicht als selbständiges Molekül in Erscheinung, sondern es ist meist Bestandteil anderer Verbindungen. Solche Substanzen sind zum Beispiel:

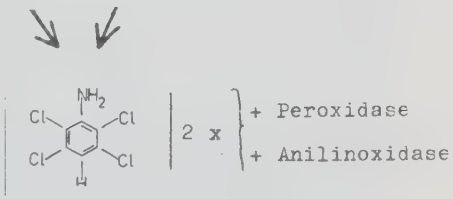
Formel:	chemische Bezeichnung:	Anwendung:
	2,3,5,6-Tetrachlor-phenylnitroamin	Herbizid
	2,3,5,6-Tetrachloro-N-[2,4-dinitro-6-(trifluoromethyl)phenyl] benzol	Rodentizid

2,3,5,6-Tetrachlorphenylnitroamin zerstört als Herbizid zum Beispiel Pflanzen wie Aligatorgras, Schweinegras oder auch Senf, verursacht jedoch nur leichte Schäden bei Getreide und Baumwolle (CROSS u. GASTROCK, 1977). DREIKORN (1977) berichtet über eine rodentizide Wirkung von 2,3,4,5-Tetrachloro-N-[2,4-dinitro-6-(trifluoromethyl)phenyl]benzol. Eine wissenschaftliche Untersuchung über den Wirkungsmechanismus und vor allem den Abbau speziell dieser Substanzen ist bisher noch nicht erschienen, dennoch ist es denkbar, daß bei einer Zersetzung 2,3,5,6-Tetrachloranilin als ein Zwischen- oder auch Endprodukt gebildet wird. KAUFMANN et al (1965) entdeckten, daß es enzymproduzierende Erdbakterien gibt, die in der Lage sind, Umweltchemikalien wie zum Beispiel Diuron^{R}, Swep^{R} oder Propanil^{R} zu spalten. Bei diesen Verbindungen handelt es sich um Derivate von 3,4,-Dichloranilin. Der Bodenpilz Geotrichum candidum produziert eine Peroxidase und eine Anilinoxidase, die für die oxidative Metabolisierung dieser Herbizide verantwortlich sind (BORDELAU u. BARTHA, 1972). Beide Enzyme wandeln die oben genannten Pestizide in das möglicherweise kanzerogene 3,3',4,4'-Tetrachloroazobenzol um, wobei in einem Zwischenschritt 3,4-Dichloranilin entsteht. Da neben dem Pilz Geotrichum candidum auch noch andere Bodenorganismen wie zum Beispiel Aspergillus-, Streptomyces- oder Pseudomonasarten (BORDELAU u. BARTHA, 1972) in der Lage sind, sowohl Peroxidasen als auch Anilinoxydasen zu bilden, ist es ebenso denkbar, daß auch zum Beispiel das Schädlingsvernichtungsmittel 2,3,5,6-Tetrachloro-N-[2,4-dinitro-6-(trifluoromethyl)phenyl]benzol in eine entsprechende Azoverbindung metabolisiert wird und dabei in einem Zwischenschritt 2,3,5,6-Tetrachloranilin freigesetzt wird. Diese Reaktion würde dann folgendermaßen verlaufen:

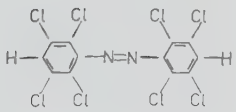
1. 2,3,5,6-Tetrachloro- N-[2,4-dinitro-6-(trifluoromethyl)phenyl] benzol



2. 2,3,5,6-Tetrachloranilin



3. 2,2',3,3',5,5',6,6'- Octachloroazobenzol



2.1.2.5 Toxikologie

Toxikologische Untersuchungen wurden bisher mit 2,3,5,6-Tetrachloranilin nicht durchgeführt. Ebenso sind keine Vergiftungsfälle bekannt, so daß man auf Vergleiche mit anderen chlorierten Anilinen angewiesen ist.

Die akute LD_{50} für Mäuse beträgt zum Beispiel bei oraler Applikation für p-Chloranilin 0,42 g/kg Körpergewicht (SZIZA u. PODHARGYAI, 1957), für 3,4-Dichloranilin 0,65 g/kg Körpergewicht (Registry of Toxic Effects of Chemical Substances, 1976) und für 2,4,5-Trichloranilin 1,0-1,5 g/kg Körpergewicht (ZSOLNAI, 1977). Es ist zu erwarten, daß der Wert bei 2,3,5,6-Tetrachloranilin in der gleichen Größenordnung liegt wie der von 2,4,5-Trichloranilin.

Im Vordergrund der toxikologischen Wirkungen von anderen chlorierten Anilinen steht ihr Einfluß auf das Blut. Sowohl durch p-Chloranilin als auch durch 3,4-Dichloranilin kommt es zur Bildung von Methämoglobin mit einer ausgeprägten Zyanose. Eine Zyanose entsteht durch p-Chloranilin ab einer Einzeldosierung von 9 mg p-Chloranilin bei einem durchschnittlichen Gewicht der Ratten von 220 g (SCOTT u.ECCLESON, 1967). 3,4-Dichloranilin führt in höheren Dosen zu einer massiven Zyanose, Methämoglobinbildung und Tod (600 mg/kg Körpergewicht)(CHOW u. MURPHY, 1975; Registry of Toxic Effects of Chemical Substances, 1976).

ISMAIL et al (1976) führten, wie bereits erwähnt, Permeationsversuche mit chlorierten Anilinen durch. Dabei konnte nachgewiesen werden, daß folgende Substanzen die Linsenkapsel von Kühen permeieren:

Substanz	Permeationsrate (in % der mit ^{14}C-markierten Ausgangslösung)	
	3 h	24 h
4-Chloranilin	17 %	44 %
2-Chloranilin	16 %	45 %
2,3-Dichloranilin	11 %	16 %
3,4-Dichloranilin	11 %	18 %
2,4-Dichloranilin	10 %	15 %
2,3,4-Trichloranilin	5 %	14 %

Es ist auffällig, daß zwischen den Monochloranilinen und Dichloranilinen eine erhebliche Differenz besteht, die sich jedoch nicht zu den Trichloranilinen hin fortsetzt. Deshalb besteht die Möglichkeit, daß die Linsenkapsel auch für Tetrachloraniline permeabel sein könnte.

2.2 Material und Methoden

2.2.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Die Versuchstiere waren weibliche Sprague-Dawley-Ratten, geliefert von der Süddeutschen Versuchstierfarm, Tuttlingen. Die Tiere wurden jeweils zu zweit oder zu dritt in einem Makrolonkäfig gehalten. Zur Unterscheidung waren die Tiere am Schwanzende mit wasserunlöslicher, farbiger Tusche markiert. Der Käfig war mit Holzspänen ausgefüttert. Als Futter stand den Tieren Altromin^{R} Standardfutter pelletiert und Leitungswasser ad libitum zur Verfügung.

2.2.2 Versuchsaufbau

Die Tiere wurden zufällig auf verschiedene Gruppen aufgeteilt (siehe Abbildung 1).
Versuch I:
Der Versuch mit der lokalen Applikation von 2,3,5,6-Tetrachloranilin umfaßte 2 Gruppen von jeweils 8 Tieren, denen einmal 2,3,5,6-Tetrachloranilin in Lösung ins Auge getropft wurde (Gruppe I1) und zum anderen eine Kontrollgruppe (Gruppe I2), welcher nur das Lösungsmittelgemisch verabreicht wurde.
Die Untersuchung mit oraler Applikation bestand ebenfalls aus 2 Gruppen zu je 8 Tieren, wobei eine Gruppe (Gruppe I3) 2,3,5,6-Tetrachloranilin plus Lösungsmittel, die andere Gruppe (Gruppe I4) nur Lösungsmittel erhielt. Da beide Untersuchungen zur gleichen Zeit stattfanden, genügte es, eine einzige Leergruppe (Gruppe I5) einzusetzen, die unter den gleichen Bedingungen gehalten wurde, jedoch völlig unbehandelt blieb. Diese Gruppe umfaßte 8 Tiere.

Wie bereits in der Problemstellung erwähnt, entstanden bei den Tieren im oralen Versuchsteil schon nach einigen Wochen Linsentrübungen. Da zwischen den Befunden der Gruppen mit 2,3,5,6-Tetrachloranilinbehandlung und der Lösungsmittelkontrollgruppe keine Unterschiede bestanden, mußte davon ausgegangen werden, daß eine der Lösungsmittelkomponentenfür die Veränderungen verantwortlich war. Aus diesem Grund wurden die Tiere der oral mit 2,3,5,6-Tetrachloranilin behandelten Gruppe am 24. Versuchstag getötet, während die Kontrollgruppe mit oraler Applikation des Lösungsmittels (vgl. Abbildung 1) zur Beobachtung weiter bestehen blieb (Gruppe I4).

Ein zwischengeschalteter Versuch (Versuch III) ergab, daß von den Lösungsmittelkomponenten das 2-Methoxyäthanol für die Kataraktentwicklung verantwortlich war, so daß für die orale Applikation nur Tween-80 weiter als Lösungsmittel benutzt werden konnte.

In einem neuen Versuch (Versuch II) wurde daher 2,3,5,6-Tetrachloranilin für die orale Applikation in Tween-80 und Aqua bidest in der in Abschnitt 2.2.3 beschriebenen Konzentration gelöst. Der Versuch II umfaßte 3 Gruppen zu je 8 Tieren: Eine Gruppe erhielt 2,3,5,6-Tetrachloranilin oral in Lösung (Gruppe II 1), die zweite Gruppe (Gruppe II 2) zur Kontrolle die Lösungsmittel und die dritte Gruppe (Gruppe II 3) blieb als Leergruppe unbehandelt. Zur besseren Übersichtlichkeit ist der Versuchsaufbau in der folgenden Tabelle noch einmal zusammengestellt:

Versuch I

Gruppe I 1	lokal	Tetrachloranilin + Tween-80 + Methoxyäthanol
Gruppe I 2	lokal	K o n t r o l l e Tween-80 + Methoxyäthanol
Gruppe I 3	oral	Tetrachloranilin + Tween-80 + Methoxyäthanol
Gruppe I 4	oral	K o n t r o l l e Tween-80 + Methoxyäthanol
Gruppe I 5	L e e r g r u p p e (unbehandelt)	

Versuch II

Gruppe II 1	oral	Tetrachloranilin + Tween-80
Gruppe II 2	oral	K o n t r o l l e Tween-80
Gruppe II 3	L e e r g r u p p e	(unbehandelt)

2.2.3 Lösungsmittel

Da die Löslichkeit der chlorierten Aniline in Wasser vom Monochloranilin zum Tetrachloranilin hin abnimmt, mußte, um für alle 4 zu testenden Chloraniline gleiche Bedingungen zu schaffen, auf andere Lösungsmittel zurückgegriffen werden. Als Lösungsmittel diente daher zunächst ein Gemisch aus 2-Methoxyäthanol und Tween-80 (Polyäthylenglycolsorbitanmonooleat) und Wasser. Bei lokaler Applikation am Auge in Tropfenform waren bei diesem Gemisch bisher keine toxischen Veränderungen am Auge aufgetreten (BÖTTEL, 1980). Nähere Angaben zu beiden Substanzen finden sich im 2. Teil der Arbeit unter 3.1.1 und 3.1.2.
Wie sich im Verlauf der Versuche zeigte, wirkt 2-Methoxyäthanol jedoch bei oraler Applikation kataraktogen, so daß für Versuch II (orale Applikation) 2,3,5,6-Tetrachloranilin allein in Tween-80 und destilliertem Wasser gelöst werden mußte.

2.2.4 Herstellung der Lösungen und Dosierung

Da für 2,3,5,6-Tetrachloranilin weder die akute noch die chronische LD_{50} bekannt sind, wurde die LD_{50} eines anderen Anilinderivates als Anhaltspunkt genommen. Für 3,4-Dichloranilin beträgt nach Auskunft des Institutes für ökologische Chemie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung die akute LD_{50} ca. 700 mg/kg Körpergewicht und die für einen Langzeitversuch wichtigere chronische LD_{50} ca. 20 mg/kg Körpergewicht. Um letzteren Wert nicht zu überschreiten, wurde für 2,3,5,6-Tetrachloranilin, wie auch für die drei anderen von KIRCHHOFF (1980), KÖSTER (1980)

und STUTZ (1980) verwendeten Anilinderivate eine tägliche Dosis von 15 mg/kg Körpergewicht verabreicht.

2.2.4.1 Orale Applikation

Versuch I:

Da das Durchschnittsgewicht aller Tiere bei Beginn des Versuchs ca. 65 g betrug, mußte jedem Tier pro Tag 1 mg Substanz appliziert werden, um die gewünschte Dosis von 15 mg/kg Körpergewicht zu erreichen. Gelöst wurde das Anilinderivat in einer Mischung aus 2-Methoxyäthanol, Tween-80 und Aqua bidest in einem Mischungsverhältnis 8:7:15. Dieser Rezeptur entsprechend wurden 15 mg 2,3,5,6-Tetrachloranilin in 3 ml Lösungsmittelgemisch gelöst, was einer 0,5 %igen Lösung entspricht. In 0,2 ml dieser Lösung ist die gewünschte Menge von 1 mg/65 g enthalten; so erhielt jedes Tier 2 mal täglich 0,1 ml Lösung mittels einer Schlundsonde appliziert. Der Gewichtszunahme der Tiere entsprechend wurde im Verlauf des Versuches die Konzentration von 2,3,5,6-Tetrachloranilin in der Lösung angehoben.

Versuch II:

2,3,5,6-Tetrachloranilin wurde in den oben beschriebenen Konzentrationen in einer Mischung aus Tween-80 und Aqua-bidest gelöst. Das Verhältnis der Lösungsmittel betrug 1:3.

2.2.4.2 Lokale Applikation

Für die lokale Applikation wurde 2,3,5,6-Tetrachloranilin ebenfalls in einer Mischung aus 2-Methoxyäthanol, Tween-80 und Aqua bidest gelöst. In der Erwartung, daß die Resorption von 2,3,5,6-Tetrachloranilin am Auge selbst bei Zugabe von Tween-80 geringer ist als bei oraler Applikation, wurde für die Augentropfen eine 2 %ige Lösung hergestellt. Da 3 mal täglich je ein Tropfen (≙ca.

17 ml) in jedes Auge eines Tieres appliziert wurde, würde dies unter Annahme vollständiger Resorption einer Gesamttagesdosis von 1 mg pro Auge bzw. von 2 mg pro Tier entsprechen. Da aber davon ausgegangen werden muß, daß nur ein Bruchteil der aufgetropften Menge tatsächlich resorbiert wird, liegen die Wirkstoffspiegel an der Linse erheblich unter diesem Wert.

2.2.5 Voruntersuchung

Vor Versuchsbeginn wurden die Linsen aller Tiere mit der Fotospaltlampe (Fa. Zeiss, Oberkochen) untersucht. Dazu wurde die Pupille mit 1 %iger Atropinlösung erweitert. Bei der Voruntersuchung wurden alle Tiere mit bereits bestehenden pathologischen Augenveränderungen ausgeschlossen. Weiter wurde das Gewicht aller Tiere festgestellt.

2.2.6 Versuchsdurchführung

2.2.6.1 Spaltlampenuntersuchung

Wie bei der Voruntersuchung wurden die Tiere auch während des Versuchs in regelmäßigen Abständen in Mydriasis an der Fotospaltlampe untersucht. Die erhobenen Linsenbefunde wurden auf Protokollbögen in 3 Ebenen zeichnerisch dargestellt. Typische Veränderungen wurden auf Agfa CT 21 photographiert.

2.2.6.2 Linsenpräparation und Linsengewichte

Nachdem die Tiere in Äthernarkose eingeschläfert waren, wurde der Bulbus beiderseits mit einer Präparierschere enukleiert. Er wurde dann am hinteren Pol mit der Rasierklinge eröffnet und die Schnitthälften mit 2 Pinzetten auseinander gezogen bis die Linse

freilag. Die Linsen wurden dann vor dem Wiegen mit Filterpapier abgetupft, um anhängende Reste des Ciliarkörpers und Glaskörpers zu entfernen. Die Linsen wurden dann auf einer Analysenwaage (Mettler; Ablesegenauigkeit 0,1 mg) gewogen.

2.2.6.3 Körpergewichte

Die Tiere wurden zu Versuchsbeginn 2 Mal, später 1 Mal wöchentlich mit einer Balkenwaage gewogen.

2.2.6.4 Histologische Untersuchung der Milzen

Die Milz wurde bei den in Äthernarkose eingeschläferten Tieren herauspräpariert und in Formol fixiert. Die histologische Untersuchung wurde im Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover durchgeführt.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Spaltlampenbefunde

Bei den regelmäßigen Untersuchungen der Linsen mit der Spaltlampe konnten weder in dem Versuch mit systemischer noch in dem Versuch mit lokaler Applikation von 2,3,5,6-Tetrachloranilin Veränderungen von pathologischem Wert festgestellt werden.

2.3.2 Linsenfrischgewichte

In Versuch II wurden nach Versuchsende die Tiere getötet und nach der Präparation die Linsenfrischgewichte bestimmt. Die Er-

gebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Es läßt sich erkennen, daß keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen. Auch mit Hilfe der einfachen Varianzanalyse läßt sich ein signifikanter Gruppenunterschied nicht nachweisen (Tab. 2).

Tabelle 1 : Linsenfrischgewichte der Gruppen II 1, II 2 und II 3 aus Versuch II.
Orale Applikation von TCA;Angaben in mg.

Tier Nr.	Gruppe II 1 (TCA)		Gruppe II 2 (Lsgsm)		Gruppe II 3 (Kontr.)	
	r	l	r	l	r	l
1	35,15	35,00	38,40	36,24	35,80	36,35
2	34,45	35,25	34,00	35,35	35,05	35,00
3	-	-[1)]	34,75	35,10	35,80	36,55
4	33,65	33,35	35,70	35,70	35,95	36,30
5	36,80	36,45	-[1)]	35,25	33,95	-[1)]
6	36,75	36,70	36,80	36,25	36,30	36,80
7	35,20	35,45	34,80	35,50	34,65	33,85
8	-	-[2)]	35,00	34,85	36,05	36,00

1) Die Messung konnte nicht durchgeführt werden
2) Das Tier verstarb während des Versuchs

Tabelle 2: Statistische Auswertung der Linsenfrischgewichte der drei Gruppen des zweiten Versuchs (TCA, oral). Mittelwertstabelle und einfache Varianzanalyse.

Gruppe:	Mittelwert(mg):	Stand.Abw.:	N:
II 1 TCA (oral)	35.35	1.17	12
II 2 Lsgsm	35.58	1.05	15
II 3 Kontr.	35.63	.92	15

Varianzanalyse:

Var.Urs.	SAQ:	FG:	MAQ:	F:	P:
Zwischen	.56645	2	.28322	.26	-
Innerhalb	42.39830	39	1.08713		
Gesamt	42.96475	41			

2.3.3 Körpergewichte

Der Einfluß der Behandlung auf die Entwicklung der Körpergewichte unter den Bedingungen einer lokalen Applikation ergibt sich aus Abbildung 2. Die in diesem Versuch systemisch behandelten Gruppen I 3 und I 4 werden bei der Auswertung nicht berücksichtigt, da die so behandelten Gruppen ja vorzeitig aus dem Versuch genommen wurden. Die Abbildung 2 läßt erkennen, daß der Gewichtsanstieg bei den behandelten Tieren geringfügig hinter dem Anstieg in der Kontrollgruppe zurückblieb. Es wurde mit der einfachen Varianzanalyse geprüft, ob die beobachteten Unterschiede sich signifikant unterscheiden. Dabei wurden Varianzanalysen für 3 Termine (Versuchsbeginn, Versuchsmitte und Versuchsabschluß) berechnet. Bei signifikantem Ergebnis der Varianzanalyse wurde die Varianz zwischen den Stichproben nach dem auf Tabelle 4 angegebenen Schema in orthogonale Kontraste zerlegt, von denen der erste für einen Effekt der Tropfbehandlung, der zweite für einen

Effekt der Substanz 2,3,5,6-Tetrachloranilin repräsentativ war.

Die Ergebnisse von Tag 0 sind auf Tabelle 3 dargestellt. Es zeigte sich, daß kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bei Versuchsbeginn bestand.

Am 63. Versuchstag (vgl. Tab. 5) hat sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p<0,05$) eingestellt. Die Zerlegung in orthogonale Kontraste (vgl. Tab. 4) läßt erkennen, daß für diesen Unterschied ein signifikanter Behandlungseffekt verantwortlich ist, während der Substanzeffekt (Unterschied zwischen Substanzgruppe und Lösungsmittelgruppe) nicht signifikant ist (Tab. 5).

Bei Versuchsende bestand dieser Unterschied nicht mehr. Zwar erwiesen sich auch jetzt noch die behandelten Gruppen als leichter. Das Ergebnis der Varianzanalyse war jedoch nicht signifikant (Tab. 6).

Ein grundsätzlich ähnliches Verhalten zeigte sich auch bei oraler Anwendung von 2,3,5,6-Tetrachloranilin bei geänderter Galenik (ohne 2-Methoxyäthanol). Die Varianzanalyse vor Versuchsbeginn (Tab. 7) zeigt zwar einen signifikanten Unterschied, jedoch ist dieser Unterschied nur geringfügig und liegt innerhalb der im ersten Versuch gefundenen Streubreite zwischen den Gruppen.

Im weiteren Verlauf erwiesen sich die behandelten Gruppen als geringfügig leichter im Vergleich zu den Kontrolltieren. Wie die beiden Varianzanalysen am 37. (Tab. 8) und am 63. Tag (Tab. 9) zeigen, war der Unterschied jedoch nicht signifikant.

Der Gewichtsverlauf in diesem Versuch ist auf Abbildung 3 graphisch dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, daß es in diesem Versuch nicht zu einer Beeinflussung der Körpergewichte durch 2,3,5,6-Tetrachloranilin gekommen ist. Unabhängig von der Wirkung der Substanz hatte die lokale Behandlung vorübergehend zu einem signifikantem Zurückbleiben der Körpergewichte geführt. Es ist möglich, daß dieser

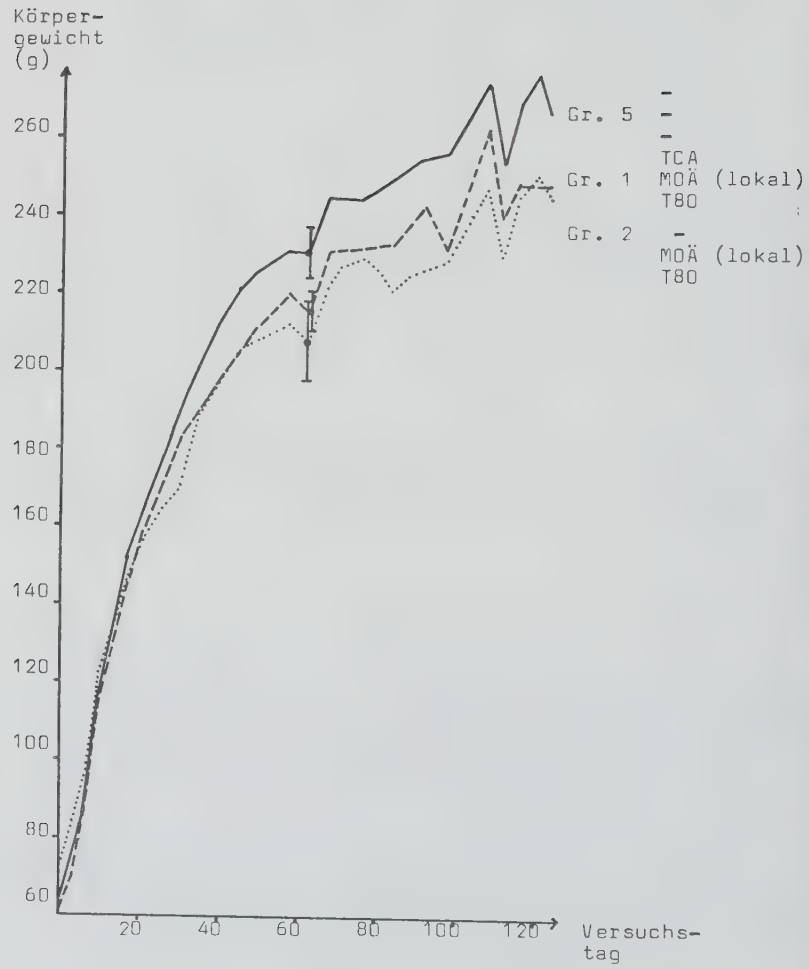


Abb. 2: Graphische Darstellung der Körpergewichte in den lokal behandelten Gruppen des Versuchs I mit Angabe der Standardabweichung am 63. Versuchstag.

Effekt auf einer Resorption des im lokalen Versuch als Lösungsmittel verwendete 2-Methoxyäthanol zurückzuführen ist. Die Wirkung von 2-Methoxyäthanol auf das Körpergewicht bei systemischer Applikation wird im 2. Teil dieser Arbeit noch ausführlich besprochen werden.

Tabelle 3 : Statistische Auswertung der Körpergewichte in den mit TCA lokal behandelten Gruppen des ersten Versuchs. Mittelwertstabelle und einfache Varianzanalyse vor Versuchsbeginn.

Gruppe:	Mittelwert(g):	Stand.Abw.:	N:
I 1 (TCA)	60.75	7.72	8
I 2 (Lsgsm)	65.88	7.22	8
I 5 (Kontr.)	62.00	6.58	7

Varianzanalyse:

Var.Urs.	SAQ:	FG:	MAQ:	F:	P:
Zwischen	113.45108	2	56.72554	1.09	-
Innerhalb	1042.37497	20	52.11874		
Gesamt	1155.82605	22			

Tabelle 4 : Schema für die Berechnung orthogonaler Kontraste zur Zerlegung der Varianz zwischen den Stichproben in einen Behandlungs- und einen Substanzeffekt.

Gruppe	Kontrast 1 (Beh.Eff.)	2 (Subst.Eff.)
I 1 (TCA)	+	+
I 2 (Lsgsm)	+	-
I 5 (Kontr.)	-	0

Tabelle 5 : Statistische Auswertung der Körpergewichte in den lokal mit TCA behandelten Gruppen des ersten Versuchs. Mittelwertstabelle am 63. Versuchstag und Varianzanalyse mit Zerlegung der SAQ zwischen den Stichproben in orthogonale Kontraste nach Tabelle 4.

Gruppe:	Mittelwert(g):	Stand.Abw.:	N:
I 1 (TCA)	215.00	11.14	8
I 2 (Lsgsm)	207.50	20.53	8
I 5 (Kontr.)	229.71	12.43	7

Varianzanalyse:

Var.Urs.:	SAQ:	FG:	MAQ:	F:	P:
Zwischen	1885.1807	2	942.5903	3.97	<0.05
Kontr. 1 (Beh.Eff.)	1660.1801	1		7.00	<0.05
Kontr. 2 (Subst.Eff.)	225.0000	1		.95	-
Innerhalb	4745.4277	20	237.2714		
Gesamt	6630.60840	22			

Tabelle 6 : Statistische Auswertung der Körpergewichte in den lokal mit TCA behandelten Gruppen des ersten Versuchs. Mittelwertstabelle und einfache Varianzanalyse am letzten Versuchstag.

Gruppe:	Mittelwert(g):	Stand.Abw.	N:
I 1 (TCA)	247.50	17.18	8
I 2 (Lsgsm)	244.50	25.28	8
I 5 (Kontr.)	265.57	20.13	7

Varianzanalyse:

Var.Urs.:	SAQ:	FG:	MAQ:	F:	P:
Zwischen	1901.24268	2	950.62133	2.12	-
Innerhalb	8969.71387	20	448.48569		
Gesamt	10870.95650	22			

Tabelle 7 : Statistische Auswertung der Körpergewichte der drei Gruppen des zweiten Versuchs (TCA, oral). Mittelwertstabelle und einfache Varianzanalyse vor Versuchsbeginn.

Gruppe:	Mittelwert(g):	Stand.Abw.:	N:
II 1 (TCA)	64.38	1.77	8
II 2 (Lsgsm)	65.01	.04	8
II 3 (Kontr.)	68.13	2.59	8

Varianzanalyse:

Var.Urs.	SAQ:	FG:	MAQ:	F:	P:
Zwischen	64.41757	2	32.20878	9.84	< 0.01
Innerhalb	68.75863	21	3.27422		
Gesamt	133.17620	23			

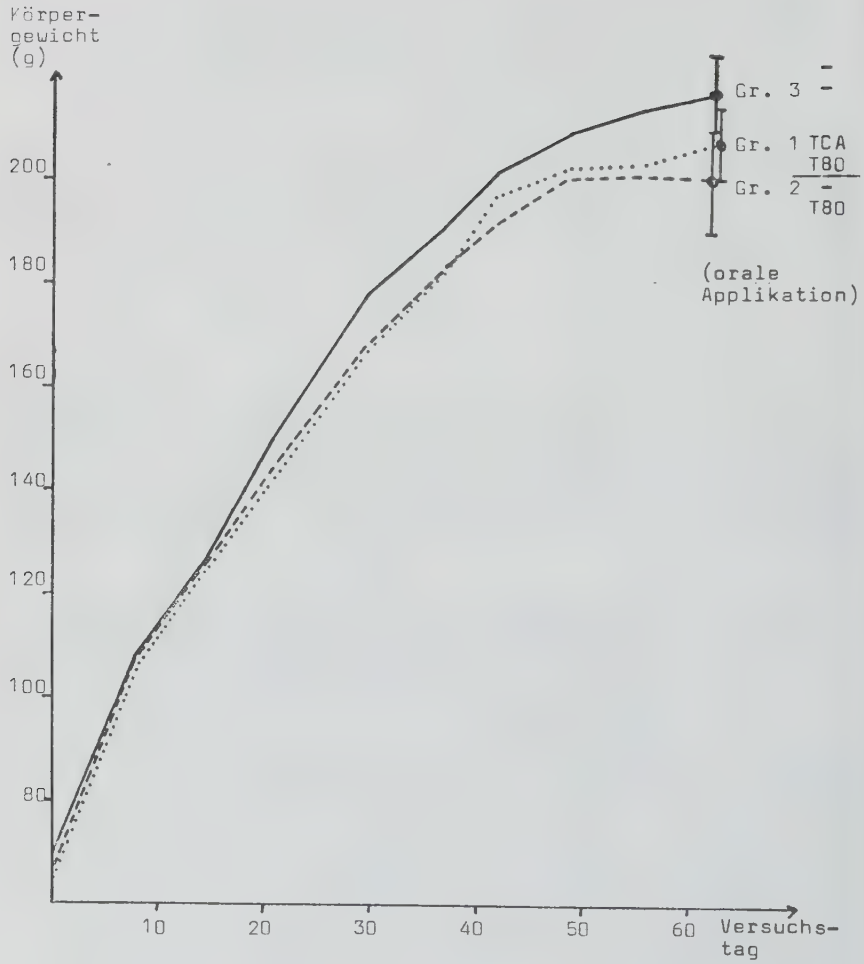


Abbildung 3: Graphische Darstellung der Körpergewichte der drei Gruppen des Versuchs II (orale Applikation) mit Angabe der Standardabweichung am letzten Versuchstag.

Tabelle 8 : Statistische Auswertung der Körpergewichte der drei Gruppen des zweiten Versuchs (TCA, oral). Mittelwertstabelle und einfache Varianzanalyse am 37. Versuchstag.

Gruppe:	Mittelwert (g):	Stand.Abw.:	N:
II 1 (TCA)	180.63	12.16	8
II 2 (Lsgsm)	181.13	9.79	8
II 3 (Kontr.)	189.75	14.27	8

Varianzanalyse:

Var.Urs.:	SAQ:	FG:	MAQ:	F:	P:
Zwischen	421.08374	2	210.54187	1.41	-
Innerhalb	3132.24951	21	149.15473		
Gesamt	3553.33325	23			

Tabelle 9 : Statistische Auswertung der Körpergewichte der drei Gruppen des zweiten Versuchs (TCA, oral). Mittelwertstabelle und einfache Varianzanalyse am letzten Versuchstag.

Gruppe:	Mittelwert(g):	Stand.Abw.:	N:
II 1 (TCA)	205.29	14.20	7
II 2 (Lsgsm)	198.75	19.78	8
II 3 (Kontr.)	215.63	13.74	8

Varianzanalyse:

Var.Urs.	SAQ:	FG:	MAQ:	F:	P:
Zwischen	1156.67505	2	578.33752	2.20	-
Innerhalb	5268.80298	20	263.44014		
Gesamt	6425.47803	22			

2.3.4 Histologische Untersuchung der Milzen

Am Ende des Versuches wurden die oral mit 2,3,5,6-Tetrachloranilin behandelten Tiere seziert (Versuch II). Dabei war eine deutliche Vergrößerung der Milzen der behandelten Tiere gegenüber der Kontrollgruppe am auffälligsten. Darüber hinaus waren die Milzen dunkel verfärbt. Zur Klärung des Befundes wurden die Milzen von je zwei behandelten und zwei Kontrolltieren herauspräpariert, in Formol fixiert und an das Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover gesandt. Die histologische Untersuchung wurde dort von Herrn Dr. Deerberg durchgeführt und hatte folgendes Ergebnis:
Ein Tier der Leergruppe zeigte ein Hyperplasie der Follikel mit aktiven Keimzentren, das andere hatte eine geringe Follikelaktivierung und war sonst ohne Befund. Bei beiden Tieren mit oraler Applikation von 2,3,5,6-Tetrachloranilin waren eine vermehrte Blutfülle und hochgradige Follikelhyperplasie mit aktiven Keimzentren zu beobachten.

2.4 Diskussion

2.4.1 Wirkung auf die Linse

Obwohl bereits nachgewiesen ist, daß bestimmte Pestizide in der Lage sind, sowohl bei Menschen (BERLINER, 1939) als auch im Tierversuch (BERNSTEIN, 1970; BHUYAN et al, 1973) Linsentrübungen hervorzurufen, gelang dies mit dem hier im Langzeitversuch getesteten 2,3,5,6-Tetrachloranilin nicht, weder bei lokaler noch bei oraler Applikation. Dabei besteht durchaus die Möglichkeit, daß 2,3,5,6-Tetrachloranilin die Linsenkapsel permeiert (ISMAIL et al, 1976) und in die Linse gelangt. Da die Dosierung im Bereich der chronischen Letalitätsdosis lag und auch die Versuchsdauer als ausreichend angesehen werden kann, ist eine kataraktogene Wirkung von 2,3,5,6-Tetrachloranilin nicht anzunehmen. Das trifft auch für die drei weiteren Aniline zu, die in Parallelversuchen

untersucht wurden (KIRCHHOFF, 1980;KÖSTER, 1980; STUTZ, 1980).

2.4.2 Wirkung auf das Körpergewicht

Bei den Körpergewichten fällt auf, daß es sowohl bei oraler als auch bei lokaler Applikation zu einer geringfügig verminderten Gewichtszunahme der Tiere im Vergleich zur Leergruppe kommt. Es ist jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit Tetrachloranilinbehandlung und den Lösungsmittelkontrollgruppen festzustellen; im Gegenteil die Kontrollgruppen liegen im Durchschnitt mit ihren Körpergewichten noch geringfügig unter den Anilingruppen. Man muß also bei diesen Ergebnissen davon ausgehen, daß die Beeinflussung des Körpergewichts der Tiere auf einen in der täglichen Manipulation begründeten Behandlungseffekt beruht und nicht auf einen durch 2,3,5,6-Tetrachloranilin hervorgerufenen Substanzeffekt. Für die mit 2-Methoxyäthanol behandelten Gruppen ist darüber hinaus zu diskutieren, ob diese Lösungsmittelkomponente sich hier ausgewirkt hat. Bei systemischer 2-Methoxyäthanolverabreichung wurde jedenfalls ein erheblicher Einfluß dieser Substanz auf das Körpergewicht festgestellt (vgl. 3.3.1).

2.4.3 Wirkung auf die Milz

Schon makroskopisch erwiesen sich die Milzen der behandelten Tiere bei der Sektion als vergrößert.
Bei der histologischen Untersuchung der Milz fand sich bei den behandelten Tieren erstens eine vermehrte Blutfülle der Milz und zweitens eine hochgradige Follikelhyperplasie. Es ist erwähnenswert, daß es bei den anderen mit chlorierten Anilinen behandelten Tieren ebenfalls zu einer Blutstauung in den Milzen kommt, wie in den bereits erwähnten parallel erstellten Dissertationen (KIRCHHOFF, 1980; KÖSTER, 1980; STUTZ, 1980) beschrieben wird. Dabei verhält sich die Intensität der Blutstauung in der Milz umgekehrt proportional zur Anzahl der Chloratome am Benzolring.

Dieser Befund läßt sich am ehesten so deuten, daß es sich um eine haematotoxische Wirkung dieser chlorierten Aniline handelt. Dem entsoricht die Beobachtung von CHOW und MURPHY (1975), die feststellten, daß Aniline zur Bildung von Methämoglobin Anlaß geben. Die beobachteten Milzveränderungen wären demnach Ausdruck eines gesteigerten Erytrozytenabbaus in der Milz.
Allerdings ist zu bedenken, daß eine Follikelhyperplasie als ein relativ unspezifischer Befund anzusehen ist, der auch bei einer Reihe weiterer infektiöser oder nicht infektiöser Schädigungen beobachtet werden kann. Immerhin hatte ja auch ein Kontrolltier eine - wenn auch nicht so ausgeprägte Follikelhyperplasie ohne ausgeprägte Spleenomegalie.

3 Über den Einfluß von 2 - Methoxyäthanol auf die Augenlinsen sowie auf Zahnbildung und Calciumhaushalt von Ratten

3.1 Einführung

Wie bereits im ersten Abschnitt erwähnt wurde, führte eine orale Applikation des ersten Methoxyäthanol-haltigen Lösungsmittelgemisches unabhängig von einer Tetrachloranilinwirkung zur Entwicklung von Linsentrübungen (Versuch I). Die Veränderungen begannen am hinteren Pol der Linse und bestanden zunächst aus einer wasserklaren subkapsulär gelegenen dreieckigen oder trapezförmigen Quellungszone im Bereich des Schnittpunktes des hinteren Lambdanaht-Systems. Verschiedentlich waren in diesem Bezirk auch zarte granuläre Einlagerungen zu beobachten. Diese Veränderungen nahmen im weiteren Verlauf an Umfang zu. Auch innerhalb der zu Anfang nur gequollenen Rindenzonen entwickelte sich dann ein zunächst fein granuläres, später ein gröberes bröckeliges Material. Der Höhepunkt der Veränderungen war durch relativ kristalline Ablagerungen gekennzeichnet, die bei der Beobachtung mit der Spaltlampe polychromatisch schillerten.
Trotz weiterer Behandlung der Tiere kam es dann zu einem Stillstand und sogar zu einer gewissen Rückbildungstendenz: Durch die Neubildung klarer Linsensubstanz wurde die Trübungszone ins Innere der hinteren Linse verlagert und verlor an Intensität. Um die Frage zu klären, welcher der Lösungsbestandteile als Ursache der Linsentrübungen anzusehen ist, wurden diese einzeln im Tierversuch überprüft (Versuch III). Hierbei zeigten sich Katarakte nur unter 2-Methoxyäthanol, während die mit Tween-80 behandelte Gruppe keine Linsentrübungen erkennen ließ. In diesem Versuch waren erstmals auch Trübungserscheinungen am vorderen Linsenpol zu beobachten, welche am Zusammenschluß der y-Naht direkt subkapsulär in der vorderen Rinde lagen und sich ebenfalls aus punktförmigen Einlagerungen zusammensetzten.
Die Ausprägung der Katarakte in diesem neuerlichen Versuch schien jedoch trotz gleicher Menge 2-Methoxyäthanol etwas leichter zu sein als die im Versuch I beobachteten Trübungen, bei der ja

2-Methoxyäthanol zusammen mit Tween-80 verabreicht wurde. Aus diesem Grunde wurde in einem weiteren Experiment (Versuch IV) 2-Methoxyäthanol in verschiedenen Dosierungen angewendet, wobei ein Teil der Tiere zusätzlich Tween-80 erhielt.

Dieser Versuch zeigte, daß, wie vermutet, die Intensität der Kataraktbildung durch einen Zusatz von Tween-80 zu 2-Methoxyäthanol deutlich gesteigert wird. Ebenfalls ließ sich nachweisen, daß die Trübungsintensität von der applizierten 2-Methoxyäthanolmenge abhängig ist. Es zeigte sich, daß eine zu hohe Dosierung von 2-Methoxyäthanol (1g/kg/die) vor allem in Verbindung mit Tween-80 die Mortalität stark ansteigen läßt; die Minimaldosis zur Erzeugung von Katarakten liegt unterhalb von 250 mg/kg/die. Eine ausführliche Darstellung der morphologischen Aspekte dieser durch 2-Methoxyäthanol hervorgerufenen Katarakte findet sich in der Dissertation Kirchhoff (1980).

Neben diesen Veränderungen am Auge führte die orale Applikation von 2-Methoxyäthanol des weiteren noch zu Störungen in der Zahnentwicklung der Versuchstiere. Diese Veränderungen sollen im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit im einzelnen beschrieben werden.

Das klinische Bild der Zahnveränderungen legte die Vermutung nahe, daß es sich um Störungen im Verkalkungsprozeß der Zähne handelte. Es ergab sich also die Frage, ob 2-Methoxyäthanol möglicherweise in den Calciumstoffwechsel der Ratte eingreift und ob sich hieraus Hinweise auf die Genese der beobachteten Veränderungen sowohl an der Linse als auch an den Nagezähnen ergeben würden. Aus diesem Grunde wurden die unter Einwirkung von 2-Methoxyäthanol beobachteten Zahnveränderungen klinisch beschrieben und klassifiziert. Von den Zähnen wurden Schliffpräparate hergestellt und mikroskopisch untersucht. Schließlich wurden auch Calciumbestimmungen im Serum sowie in den Hartsubstanzen von Zähnen und Knochen durchgeführt.

In der Einleitung zu diesem zweiten Teil sollen zunächst die beiden Lösungsmittelbestandteile 2-Methoxyäthanol und Tween-80 beschrieben werden. Sodann folgt eine Darstellung des Calciumstoffwechsels der Ratte und der Biochemie der Verkalkung unter besonderer Berücksichtigung der Nagezähne sowie eine Zusammenstellung bisher bekannter chemisch induzierter Zahnveränderungen nebst möglicher Wirkungsmechanismen.

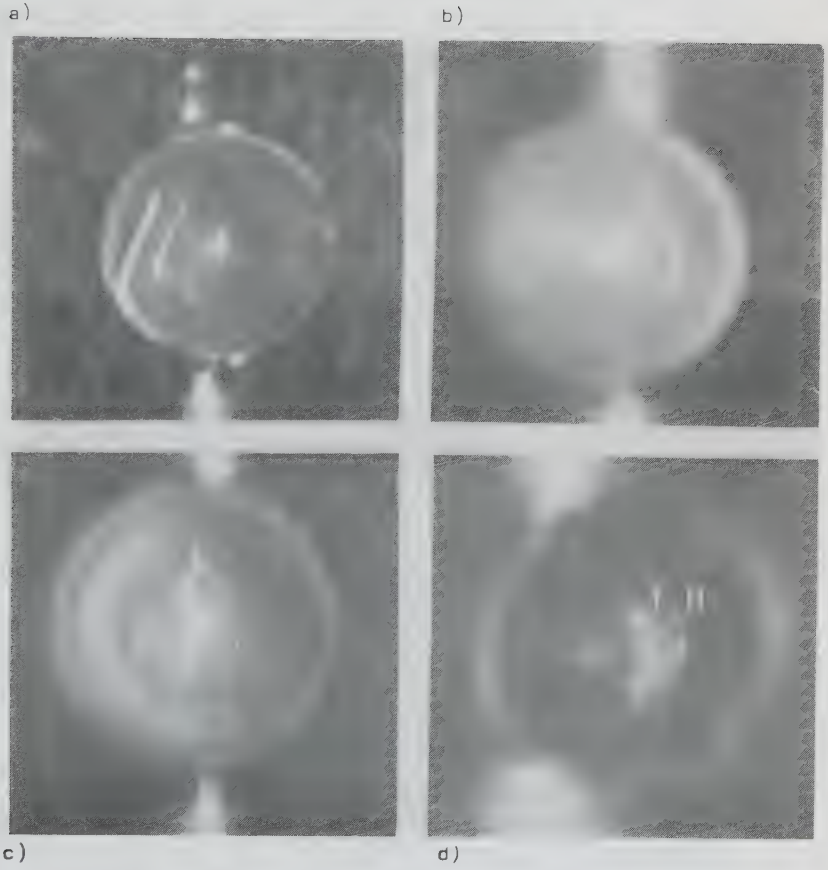


Abb. 4: Spaltlampenuntersuchung von MOÄ-Katarakten:
a) Beginn als beetartiger klarer trapezförmiger Quellungsbezirk (36. Tag, Versuch I, 750 mg/kg KG MOÄ + Tween).

b) Feingranuläre Trübung im trapezförmigen Bereich (43. Tag, dito).

c) Dreieckig kristalline Trübung im linken Rindenbereich (44. Tag, dito).

d) Abrücken der getrübten Zone von der hinteren Kapsel in die tieferen Rindenschichten im weiteren Verlauf (T = Trübungsschicht, H = hintere Kapsel; 71. Tag, dito).

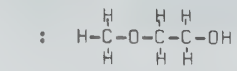
3.1.1 2-Methoxyäthanol

Weitere chemische Bezeichnungen:

ß-Methoxyäthanalkohol
1-Hydroxy-2-Methoxyäthan
Methyl-2-Hydroxyäther

Trivialnamen: Methylcellosolve
Methylglykol
Glykolmonomethyläther
Äthylenglykolmonomethyläther

3.1.1.1 Physiko-chemische Eigenschaften

Strukturformel : 

Summenformel : $C_3H_8O_2$

Molekulargewicht : 76,094

Spezif. Gewicht	:	0,963 g/cm^3 bei 25°C
		0,9646 g/cm^3 bei 20°C
Siedegrenzen	:	123,5°C - 125,5°C bei 1013 mbar
Gefrierpunkt	:	- 85,1°C
Dampfdruck	:	2,0 mbar bei 0°C
		9,3 mbar bei 20°C
		9,7 mbar bei 25°C
		40 mbar bei 50°C
		330 mbar bei 100°C

Gesättigte Luft enthält 1,28 Vol.% 2-Methoxyäthanol.

Relative Dichte der gesättigten Luft : 1,021 (Luft = 1)

Verdunstungswärme bei 1031 mbar : 519 J/g

Flammpunkt : 38°C

Zündtemperatur : 285°C

1 ppm = 0,00311 mg/l

1 mg/l = 322 ppm

2-Methoxyäthanol ist eine farblose, wasserklare Flüssigkeit mit schwachem, angenehmen, mildätherischem Geruch. Es ist eine mehr oder weniger hygroskopische, mit den meisten organischen Lösungsmitteln sowie mit Wasser beliebig mischbare Flüssigkeit, mit höheren aliphatischen Kohlenwasserstoffen nur beschränkt mischbar, in Styrol- und Polyvinylmischpolimerisaten sowie Fetten, Ölen und wenig polaren Harzen praktisch unlöslich. Gutes Lösungsmittel für die meisten natürlichen und synthetischen Harze, für Nitro-, Acetyl- und Äthylzellulosen, Chlorkautschuk, Weichmacher u.a. (vgl. RÖMPP, 1974; ULLMANN, 1960; HYGIENIC GUIDE SERIES, 1970).

3.1.1.2 Synthese

Wie alle Äthylenglykolmonoäther durch Umsetzen des Alkohols (Äthanol) mit Äthylenoxid in Gegenwart alkalischer oder saurer Katalysatoren in exothermer Reaktion oder durch direkte Alkylierung von Glykol mit einer alkylierenden Substanz, z.B. Dialkylsulfat (vgl. ULLMANN, 1960).

3.1.1.3 Verwendung

In der Lackindustrie wird 2-Methoxyäthanol als Lösungs-, Verdünnungs- und Veredelungsmittel für Streich- und Einbrennlacke verwendet. Es regelt die Verdunstungszeit und verbessert den Verlauf und den Glanz von Lackschichten. Es dient als Farbstofflösungsmittel für Druckpasten, Tuschen, Tinten, Lederfarbstoffe, natürliche und synthetische Harze und für Holzbeizen. Es wird Flugzeugkraftstoffen als Eisbildungsverhinderer zugesetzt; als Zusatz zu Automobilkraftstoffen wirkt es der Vergaservereisung entgegen. Weitere Verwendungsmöglichkeiten sind Destillation von Kohlenwasserstoffen und Alkoholen, Reinigungsmitteln, Klebstoffzusatz und vieles andere mehr. Es wird außerdem zu den als Lacklösungsmitteln verwendeten Acetaten und den als Weichmacher bekannten Phtalaten weiterverarbeitet.

3.1.1.4 Toxikologie

Akute Vergiftungen mit 2-Methoxyäthanol bei Menschen sind bisher in drei Fällen bekannt geworden; einer davon mit tödlichen Ausgang (YOUNG u. WOOLNER, 1946). NITTER-HAUGE (1970) beschrieb 2 Fälle, wobei bemerkenswert ist, daß es bei einem Patienten zu einer erhöhten Ausscheidung von Oxalsäure im Urin kam.
Bei den chronischen Vergiftungen handelt es sich meist um Arbeiter, die durch ihren Beruf in Kontakt mit 2-Methoxyäthanol kamen,

wobei 2-Methoxyäthanoldampf eingeatmet wurde oder möglicherweise auch durch die Haut permeierte (DUNLEY, 1936; PARSON u. PARSON, 1938; GREENBERG et al, 1938; MITCHEL u. ZAVON, 1963).

Als gemeinsames Symptom sowohl bei der akuten wie auch bei der chronischen Vergiftung mit 2-Methoxyäthanol steht eine encephalopathische Wirkung im Vordergrund. Bei der akuten Vergiftung werden daneben noch Nierenschädigungen beschrieben, während bei der chronischen Vergiftung Veränderungen im Blutbild auffällig sind.

CARPENTER et al (1956) haben in Tierversuchen die akute LD_{50} für 2-Methoxyäthanol ermittelt: Meerschweinchen 0,95 g/kg,
Kaninchen 0,89 g/kg,
Ratte (männlich) 3,25 g/kg,
Ratte (weiblich) 3,4 g/kg.

Bei massiven Gaben hat das Mittel eine narkotisierende Wirkung.

Untersuchungen über die chronische Wirkung von 2-Methoxyäthanol bei oraler und parenteraler Applikation sowie Inhalationsversuche wurden von GROSS (1938) durchgeführt.

Ähnlich wie beim Menschen stehen auch beim Tier bei oraler oder parenteraler Applikation von 2-Methoxyäthanol Leber-, Magen-, Darm- und vor allem Nierenschäden im Vordergrund (CARPENTER et al, 1956; WILEY et al, 1938).

Bei den Inhalationsversuchen überwiegen Lungen- und Blutschäden (WERNER et al, 1943; STARREK, 1938). Eine Wirkung auf das Nervensystem, angezeigt durch ataktische Bewegungen und Zittern, sind für eine Vergiftung mit 2-Methoxyäthanol unabhängig von der jeweiligen Applikationsform charakteristisch.

Besonders sei auf die Wirkung von 2-Methoxyäthanol bei kutaner und oculärer Applikation eingegangen, da sie neben der oralen Verabreichung Teil dieser Untersuchung sind. 2-Methoxyäthanol durchdringt die intakte Haut sehr gut. Quantitative Messungen von DRAIZE et al (1944) kamen zu einer LD_{50} von annähernd 2 g/kg Körpergewicht. Die Anzeichen der Vergiftung sind die gleichen wie bei anderen Applikationsformen. Untersuchungen von CARPENTER und SMYTH (1946) an Rammlern mit einem Gewicht von 2,5 - 5 kg, deren Haut 24 Stunden unverdünntem 2-Methoxyäthanol ausgesetzt war, kamen zu einer LD_{50} von 1,34 ml/kg Körpergewicht.

Bei lokaler Applikation am Kaninchenauge verursacht unverdünntes 2-Methoxyäthanol Schmerzen, Veränderungen an der Konjunktiva und Hornhauttrübungen. Letztere erwiesen sich als reversibel und verschwanden nach 24 Stunden (ROWE, 1963). STARREK (1938) beschreibt weiterhin noch eine geringe Eitersekretion. Im Institut für experimentelle Ophthalmologie in Bonn wurde 2-Methoxyäthanol als Lösungsmittel für verschiedene Pestizide verwendet und auf diesem Wege in verdünnter Form in die Augen von Ratten getropft. Dabei wurden bisher keine bedeutenden pathologischen Veränderungen festgestellt (BOETTEL, 1980).

3.1.2 Tween-80

Die exakte chemische Bezeichnung ist Polyoxyäthylenglycolsorbitanmonooleat. Weitere Bezeichnungen sind: PAG(300)-Sorbitanoleat, Polysorbate 80 (engl.), Sorbimakrogololeat 300 (DAB 7).

Tween-80 ist eine visköse, hellgelbe bis bräunlichgelbe, ölige Flüssigkeit mit schwachem Geruch und leicht bitterem Geschmack.
Molekülform:

a+b+c+d = 20

R = $C_{17}H_{35}CO-O-$

3.1.2.1 Physiko-chemische Eigenschaften

Dichte $^{40}_{20}$	:	1,079 - 1,018
Spez. Gewicht	:	1,08
Hydroxylzahl	:	65 - 80
Verseifungszahl	:	45 - 60
Säurezahl	:	max. 2
Jodzahl	:	19 - 24
Löslichkeitsverhalten	:	Mit Äthanol und Chloroform mischbar, in Wasser und Öl gut löslich und in Benzin sowie flüssigen Paraffinen praktisch unlöslich. Konzentrierte Lösungen mit einem Gehalt von 50-65% zeigen Gelbildung.

(vgl. RÖMPP, 1977)

3.1.2.2 Synthese

Tween-80 entsteht durch Veresterung von Sorbitan mit 1 Mol Ölsäure und direkt anschließender Reaktion des Sorbitanoleats mit 20 Mol Äthylenoxid (BÜHNE u. HARTKE, 1968).

3.1.2.3 Verwendung

Tween-80 wird verwendet als dispergierendes, emulgierendes, lösungsvermittelndes und damit oberflächenaktives Mittel zur Lösung wasserunlöslicher Substanzen (z.B. ätherische Öle), als Grundlage von Salben und Tropfenpräparaten in der Pharmazeutischen Industrie sowie als weit verbreitetes Hilfsmittel in der Lebensmittelindustrie (z.B. Backwaren, Sandkuchen, Schokolade, Soßen, Eiskrem u.v.a.m.).

3.1.2.4 Stoffwechsel und Ausscheidung

Tween-80 wird quantitattiv im Urin und Stuhl ausgeschieden, eine mögliche Oxalsäurevergiftung scheint daher ausgeschlossen; Urinuntersuchungen ergaben keinen Hinweis auf eine Oxalurie (KRANZ, 1948). Tween-80 hydrolysierende Enzyme sind beim Menschen im Pankreasextrakt (HALL, 1961) und bei Tieren im Fettgewebe (WALLACH, 1962) nachgewiesen worden.

3.1.2.5 Toxikologie

Ernährungsversuche über Monate bei Menschen und Tieren (JONES, 1948) ergaben keinen Hinweis auf pathologische Veränderungen. Beschrieben wurden laxierende Effekte (OSER, 1957) und eine gewisse absorptionsdynamische Wirkung (JONES, 1948; KANEDA et al, 1975; HIKAL, 1976).
In vivo als auch in vitro verliefen Versuche mit Tween-80 am Auge durchweg negativ (HAGIWARA, 1953; TREON, 1966; LAMBERT, 1968), nach Injektion in die vordere Augenkammer kam es jedoch zu Hornhautquellungen, perilimbalen Entzündungsreaktionen und einer Permeabilitätszunahme von Blutgefäßen (KUWABARA, 1957; QUIROGA, 1967).

3.1.3 Calciumhaushalt der Ratte

3.1.3.1 Gesamtcalciumhaushalt

Bei der Entstehung der Hartgewebe des Körpers findet sich bei aller Verschiedenheit im Einzelnen dennoch stets der prinzipiell gleiche Entstehungsprozeß: Aus hochspezialisierten Zellen wird eine Matrix teils sezerniert, teils abgelagert; dabei besteht diese Matrix immer aus einem faserigen Gerüst (Kollagen beim Dentin, Zement und Knochen sowie Keratin beim Schmelz), das in

eine amorphe organische Grundsubstanz eingebettet ist (Mukoproteine). Entlang der Fibrillen kommt es zunächst zu diskreten Verkalkungsprozessen, die später miteinander konfluieren und so die für die Funktion der Hartgewebe notwendige Steife und Härte ergeben. Bei der Verkalkung von Knochen und Zähnen bilden sich meist dem Apatit ähnliche Kristalle, die dann an ihrer charakteristischen Kristallstruktur erkannt werden können. Auf diese Art und Weise sind 99 % des im Körper vorkommenden Calciums in den Hartgeweben gebunden (vgl. BUDDECKE, 1974). Andere Autoren beschreiben neben dem Apatit noch einen amorphen Anteil, worauf später eingegangen wird. Der gesamte Calciumgehalt der Ratte beträgt bei einem 17 - 21 Tage altem Tier 17 - 22 % der fettfreien Trockensubstanz, bei einer 15 Monate alten Ratte 27 - 28 % (CREMER u. FÜHR, 1954). WIDDOWSON (zit. nach HAGEMANN, 1960) gibt bezogen auf das fettfreie Frischgewicht einen Calciumgehalt von 306 mg/100g bei der neugeborenen Ratte an und 1,3 g/100g bei einem erwachsenen Tier.

3.1.3.2 Calciumaufnahme und Calciumstoffwechsel

Calcium wird mit der Nahrung aufgenommen. Die für die Ratte täglich notwendige Ration beträgt etwa 0,5 % - 0,6 % der Nahrung, was etwa 40 - 50 mg entspricht (Mc COY, 1949). Dabei ist die Assimilation unabhängig davon, ob das Calcium als Karbonat, Phosphat oder Glukonat verabreicht wird. Jedoch ist Calciumoxalat für die Ratte nicht resorbierbar (FAIRBANKS u. MITCHELL, 1938). Eine Calciummangeldiät mit einem Calciumanteil von nur 0,01 % führt zu einer um 30 % geringeren Gewichtsentwicklung als bei den Ratten der Kontrollgruppe (KLEIBER, BOELTER u. GREENBERG, 1940). Ein Calciummangel macht sich nach 4 - 5 Wochen zunächst am verringerten Wachstum bemerkbar. Nach etwa 8 - 9 Wochen werden die Tiere träge und teilnahmslos. Sie reagieren kaum noch auf Reize. Die Tiere bekommen mehr oder weniger starken Haarausfall, später kommt es zur Paralyse der Hinterbeine. Die Knochen werden stark demineralisiert, ihr Calciumgehalt sinkt um die Hälfte. Bereits nach 2 Wochen sinkt der Calciumgehalt des Blutes

auf 5 mg/100 g (HAGEMANN, 1960). Der Normalwert liegt bei 8,8 - 10,9 mg/100 ml (KLAUS u. KOLB, 1962). Für den Calciumstoffwechsel der erwachsenen Ratte gibt HAGEMANN folgende Werte an:

Einnahme in 24 Stunden	:	31,4 mg
Ausscheidung	:	22,92 mg
Absorption	:	35,3 %
Retention	:	27 %

3.1.3.3 Calcium im Blut

Der normale Serum-Calcium-Gehalt der Ratte wird von KLAUS und KOLB (1962) mit 8,8 - 10,9 mg/100 ml angegeben. Dieser Wert deckt sich weitgehend mit den Ergebnissen anderer Autoren. Calcium liegt im Blut z.T. in ionisierter Form als Ca^{2+}-Ion und z.T. an Eiweiße gebunden als Ca-Proteinat vor. Dabei entfallen beim Menschen 40 % auf die ionisierte und 60 % auf die an Eiweiße gebundene Form. Beide stehen über das Massenwirkungsgesetz miteinander in Beziehung, sind also ineinander überführbar. Proteingebundenes Calcium diffundiert nicht, während nicht gebundenes Calcium diffundiert. Ein kleiner Anteil des diffundierenden Calciums bildet normalerweise einen Komplex mit Citrat und Phosphat. Der Rest ist ionisiert und dies ist die physiologisch aktivste Form.

3.1.3.4 Calcium im Skelett

In den Knochen und Zähnen liegt Calcium als Carbonapatit, Fluorapatit und Hydroxylapatit vor. Der Apatitkristall stellt aufgrund seiner großen Oberfläche (200 m^2/g) besonders im Bereich der Epiphyse und Spongiosa des Knochens eine labile Phase dar, die einem ständigen Stoffaustausch (Mobilisierung und Einlagerung) unterliegt (vgl. BUDDECKE, 1974).
TERMINE und POSNER (1967) beschreiben im Knochen neben der kristallinen Form ein amorphes Calciumphosphat. Der Anteil

des amorphen Calciumphosphats am gesamten Calciumgehalt ist bei der Ratte vom Alter abhängig und vermindert sich von 67,2 % bei einem drei Tage alten Tier auf 36,9 % bei einem 80 Tage alten Tier. Da amorphes Calciumphosphat bei in-vitro-Versuchen in Apatit umgewandelt wurde, sehen TERMINE und POSNER (1967) in ihm das erste Mineral, das während des Verkalkungsprozesses abgelagert wird. Weiter vermuten sie, daß amorphes Calciumphosphat als einen metabolisch aktiven, metastabilen Vorgänger des kristallinen Knochenapatit darstellt.

3.1.3.5 Calciumgehalt der Nagezähne und der Knochen

Die in der Literatur angegebenen Werte für den prozentualen Calciumanteil sind in Tabelle 10 zusammengestellt. Zu dieser Tabelle ist noch hinzuzufügen, daß die Autoren SELVIG und HALSE (1972) ohne Zahlenbelege in ihrer Arbeit erklären, daß es zwischen der Schmelz-Dentin-Grenze und der Schmelzoberfläche keine wesentlichen Unterschiede in der Calciumverteilung gibt. Eine Ausnahme machen die äußersten 15 - 20 µm, die dem pigmentierten Schmelzanteil entsprechen. Auch ein Verteilungsunterschied bei Untersuchungen in verschiedenen Abständen von der Inzisalkante für den in die Mundhöhle durchgebrochenen Anteil besteht nicht. Leider war es nicht möglich, detaillierte Zahlenwerte für den Calciumanteil des Zementes der Nagezähne der Ratte zu erhalten. Wahrscheinlich liegen diese Werte - ähnlich wie beim Menschen - niedriger als die Werte für das Dentin und im Bereich der Werte für den Knochen. Der Zahnzement des Nagezahns des Meerschweinchens besteht aus 24,11 % $\pm$ 0,71 % Calcium (LISTGARTEN u. SHAPIRO, 1974). Die Werte in der Rubrik der Autoren WYNN et al (1957) sind überarbeitete Durchschnittswerte, da die Autoren Ca-Werte für verschiedene Ca/P-Relationen in der Nahrung angeben.
Der Calciumanteil des Knochens beträgt 25,41 % nach HARTLESS (1951) und 24,3 % nach LEAVER (1971). Beide Autoren arbeiten nach der von HARTLESS (1951) beschriebenen Bestimmungsmethode.

Tabelle 10: Calciumgehalt der Nagezähne der Ratte in Gewichts %.

Autoren	Johnson, 72	Wynn et al, 57	Halse, 71	Halse, 72	Selvig u. Halse, 72	Halse u. Selvig 74	Hartless, 51 u. Cremer, 54
Methode	EMA[1]	acidometr.	EMA	EMA	EMA	EMA	
Zahnregion	inc., med., apic.		5mm unter Incisalkan.	5mm unter Incisalk.	2mm unter Incisalk.	9mm ← 5mm ← apical	
Oberfläche	32,3 24,8 27,8			28,2		Pigment 1-2	
15-18 u						7	
25				34,8 (33,3-36)			
30							
50	34,o 35,1 3o,8	33,o5			35,5 (33,6-38)	35 3o	32,2 ±o,4
80			33,8 (32,5-35,2)				
100	34,1 34,2 28,4						
SDG[2]	3o,1 33,7 29,9					18	
100	24,1 26,6 3o,8						26,5 ±1,7
200	26,7 26,2 32,7						
300	24,6 25,8 31,3	24,85					26,o ±o,3
400	19,8 28,6 3o,o						
500	23,2 26,4						
600	24,2						
700	25,6						
Zement							

Schmelz

Dentin

1) EMA: Elektronen-Mikroproben-Analyse
2) SDG: Schmelz-Dentin-Grenze

3.1.3.6 Regulation des Calciumstoffwechsels

Calciferol (Vitamin D)

Die Resorption des Calciums aus dem Intestinaltrakt wird durch Calciferol (Vitamin D) gefördert. Dieses regt die Mukosalzellen zur Bildung eines spezifischen calciumbindenden Proteins an. Weiter wird eine direkte Wirkung auf den Knochenstoffwechsel vermutet, da sich bei Untersuchungen mit markiertem Vitamin D eine Anreicherung in den Epiphysenfugen zeigte und sich die Bildung eines calciumtransportierenden Proteins nachweisen ließ (WASSERMANN, 1968). Vitamin D entsteht aus Cholesterin durch Dehydrierung zum 7-Hehydrocholesterin, das unter UV-Strahlen in der Haut in Cholecalciferol übergeht. Dieses wird in der Leber in 25-Hydroxycholecalciferol umgewandelt, aus dem in der Niere die eigentliche Wirkform, das 1,25 - Dihydroxycholecalciferol entsteht.

Parathormon

Parathormon wird von den Nebenschilddrüsen gebildet. Parenterale Gaben bewirken einen Anstieg des Serum-Calcium, sowie eine Entmineralisierung des Knochens. Dies geschieht einmal durch eine stimulierende Wirkung auf die Osteoblasten, was sich an einem Anstieg der RNA-Synthese und einer Aktivitätszunahme der Enzyme der Glykolyse und des Citratzyklus zeigen läßt, zum anderen durch eine Verbesserung der Resorption aus dem Intestinaltrakt und die Abgabe von Calcium aus den Mucosazellen in den Blutkreislauf.

Calcitonin

Calcitonin steht in antagonistischer Wirkung zum Parathormon. Es führt bei der Ratte schon in Dosen von 0,05 µg zu einer Senkung des Blutcalciumspiegels, die durch eine stimulierende Wirkung auf die Osteoblasten und vermehrte Calciumphosphatdeponierung im Skelettsystem zustande kommt, sowie durch die Hemmung des Übergangs vom Skelettcalcium zum Blutcalcium. Calcitonin wird in den parafollikulären Zellen der Schilddrüse gebildet.

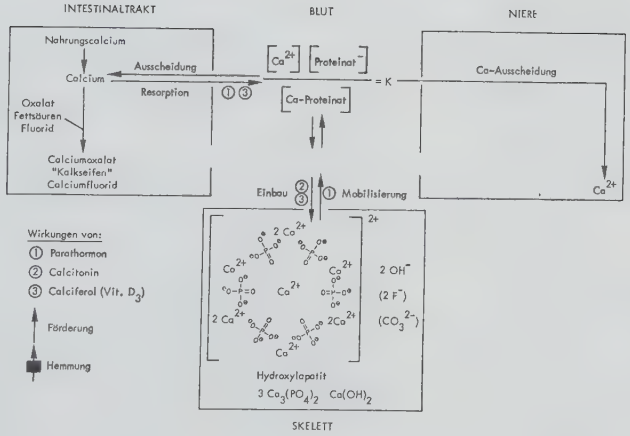


Abbildung 5: Schema des Calciumstoffwechsels (vgl. BUDDECKE, 1974).

3.1.4 Biochemie der Verkalkung

Die biochemischen Vorgänge, die sich bei der Verkalkung eines Gewebes ereignen, sind auch heute noch nicht vollständig geklärt. Verschiedene Theorien haben sich gebildet, die sich in zwei Gruppen zusammenfassen lassen (SCHMIDT, 1967):

1. Theorien mit vorwiegend nicht enzymatischem Charakter,
2. Theorien mit vorwiegend enzymatischem Charakter.

Zwischen beiden Gruppen gibt es fließende Übergänge.

3.1.4.1 Theorien mit vorwiegend nicht enzymatischem Charakter

Die Sekretionstheorie geht davon aus, daß Apatitkristalle als spezifisches Sekretionsprodukt der hartsubstanzbildenden Zellen in eine Matrix ausgeschieden werden (KLOTZ, 1905; RÖHMANN, 1916). Gegen diese Theorie spricht, daß es ohne Beteiligung spezifischer Zellen zu Verkalkungen kommen kann.

Die Eindickungstheorie besagt, daß es durch Wasserverlust der Matrix zur Ausfällung von Calciumverbindungen kommt, wobei dem Kollagen eine nucleierende Wirkung zukommt (PAULI u. SAMEC, 1909; GERSH, 1960).

Bei der Kalkfängertheorie kommt es durch einen formativen Reiz der knochenbildenden Zellen zur Umwandlung eines Bestandteiles der Matrix, der dadurch eine erhöhte Affinität zu Calciumsalzen des Blutes bzw. der Gewebeflüssigkeit gewinnt. Diese Salze werden beim Abbau der organischen Matrix ausgefällt. Als Kalkfänger wird die Chondroitinschwefelsäure diskutiert (PFAUNDLER, 1904 a-d).

Die Adsorptionstheorie sieht eine Veränderung im Gewebestoffwechsel, durch die es zur Bildung eines Calcium-Phosphat-Eiweiß-Komplexes bzw. eines Calcium-Carbonat-Eiweiß-Komplexes kommt, der sich in Calcium-Phosphat bzw. -Carbonat und bindendes Eiweiß aufspaltet. Auch hier wird die Chondroitinschwefelsäure als Kalksalzfänger in Erwägung gezogen (FREUDENBERG u. GYÖRGY, 1923 a,b).

Die von SOBEL begründete Theorie vom "lokalen Faktor" wurde von vielen Autoren aufgegriffen und modifiziert. Im wesentlichen beruht diese Theorie darauf, daß in den verkalkten Geweben ein

Makromolekül angenommen wird, welches in der Lage ist, Calcium, Phosphat oder Calciumphosphat und Hydroxylionen zu binden und diese durch die sterische Anordnung der Moleküle in einer dem Apatit nahestehende Konfiguration zu ordnen. SOBEL selbst sieht die Chondroitinschwefelsäure als Teil des "lokalen Faktors" (SOBEL, 1955). Andere lokale Faktoren sind weitere Mukopolysaccharide, das Kollagen (GLIMCHER, 1959), nicht kollagene Eiweiße (WADDEL, 1972) sowie 2-Aminogalaktose-6-phosphat in Verbindung mit weiteren Matrixbestandteilen (DISTEFAVO, NEUMANN u. ROUSER, 1953). Von entscheidender Bedeutung für die Anlagerung von Calcium scheinen die Karboxylgruppen der Moleküle zu sein, da es nach deren Blockierung zu keiner Calciumaufnahme mehr kommt (NORMAN u. WALKER, 1972). Die Nukleationszentren des Kollagens können durch Mukopolysaccharide blockiert sein und werden erst nach deren Depolymerisation freigesetzt. Dabei wird gleichzeitig die Kationenadsorptionskapazität der Grundsubstanz verringert, also Calcium freigesetzt (GLIMCHER, 1959). Die unter anderem von HOLT (1925) vertretene Theorie der echten Fällung von Calciumsalzen sieht eine Ausfällung von tertiärem Calciumphosphat nach Überschreiten des Lösungsgleichgewichtes. Da jedoch die Bildung tertiären Calciumphosphats über das sekundäre geht, müßte eigentlich dieses primär zur Ausfällung kommen. Der Wert des Löslichkeitsproduktes für sekundäres Calciumphosphat wird jedoch im normalen Serum nicht überschritten (SCHÜTTE, 1956).

3.1.4.2 Theorien mit vorwiegend enzymatischem Charakter

Nach der Phosphatasetheorie spaltet eine von den matrixbildenden Zellen sezernierte alkalische Phosphatase aus organischen Phosphorsäureestern anorganisches Phosphat ab (ROBINSON, 1923; ROBINSON u. SOAMES, 1924). Die organischen Ester entstammen einmal direkt dem Blutkreislauf sowie der Glykolyse (HARRIS, 1932). Nach CARTIER (1948 a,b; 1949) wird das Phosphat vom ATP abgespalten, als Pyrophosphat an die ε-Aminogruppe des Lysins und Hydroxylysins der Kollagenfibrillen gebunden (CARTIER u. LANZETTE, 1963).

FLEISCH und NEUMANN (1961) sehen eine abweichende Aufgabe der Phosphatase im Verkalkungsprozeß. Danach sind die Nukleationszentren durch vermutlich Pyro- oder Triphosphat blockiert, die von der Phosphatase zerstört werden. Nach der Kohlensäurehydratasetheorie wird die Ausfällung von für die Knochenbildung angeblich essentiellem Carbonat oder Bicarbonat durch die Kohlensäurehydratase katalysiert (MC CONNEL, FRAJOLA u. DEAMER, 1961). HALSTEAD (1969) diskutiert die Frage, ob die Mitochondrien bei der Verkalkung eine Rolle spielen, da sie Calcium und Phosphor im Molverhältnis von 1 : 1,7 aufnehmen und Calciumhydrogenphosphat abgeben.

Welche der hier angegebenen Theorien oder ob überhaupt eine von ihnen der weiteren wissenschaftlichen Überprüfung standhält, wird die Zukunft zeigen. Hier sei noch kurz die zusammenfassende Beschreibung des Mineralisationsvorganges erwähnt, die BUDDECKE (1974) gibt. Danach gliedert sich der Vorgang in vier Schritte: Im ersten wird Chondroitinsulfatprotein enzymatisch abgebaut und dadurch wird das von ihm komplex gebundene Calcium frei. Im nicht verknöcherten Knorpel maskieren die Chondroitinsulfatproteine die freien ε-Aminogruppen des Lysin bzw. Hydroxylysin im Kollagen. Im zweiten Schritt werden die ε-NH_2-Gruppen mit Pyrophosphat verknüpft unter Mitwirkung von ATP und einer ATP-ase. Im dritten Schritt bilden die Pyrophosphatgruppen einen Calciumkomplex, der als Kristallisationskeim (Nucleus) wirkt. Im letzten Schritt lagern sich weitere Apatitkristalle an.

BUDDECKE (1974) präsentiert also eine Mischung der Theorien vom "lokalen Faktor" sowie der Phosphatasetheorie.

Nimmt man jedoch nur das Kollagen als möglichen lokalen Faktor an, ist die Mineralisation der Zähne nicht zu erklären, da im Schmelz bisher kein Kollagen nachgewiesen werden konnte. Deshalb muß auch die Chondroitinschwefelsäure als lokal wirksamer Faktor zumindest bei der Mineralisation des Schmelzes und des Dentins in Betracht gezogen werden, da sie wie das Kollagen über karboxyltragende Seitenketten verfügt und in beiden Zahnbestandteilen nachgewiesen werden konnte (BUGESS, NIKIFORUK u. MACLAREN, 1960; CLARK, SMITH u. DAVIDSON, 1965). Darüber hinaus wurde im Dentin eine erhöhte Affinität der Calciumsalze zu metachromatischen Strukturen wie Chondroitinschwefelsäure nachgewiesen (SCHMIDT,

1967).

3.1.5 Nagezähne der Ratte

Wie bereits im letzten Abschnitt anklang, weicht die Mineralisation der Zähne in einigen Punkten von der des Knochen ab. Aus diesem Grund soll hier ein kurzer Abriß der Entwicklung der Nagezähne der Ratte gegeben werden:
Wie der menschliche Zahn besteht auch der Zahn der Ratte aus drei verschiedenen Hartsubstanzen (Schmelz, Dentin, Zement), allerdings ist speziell beim Nagezahn die Anordnung derselben abweichend von der Norm. Während das Zahnbein (Dentin) das Zahnmark (Pulpa) allseitig umhüllt, bedeckt der Schmelz nur die labiale Fläche des Zahnes,und der Zement, der normalerweise nur als Wurzelzement auftritt, begleitet den Zahn bei seinem Wachstum in die Mundhöhle und bedeckt die approximale und die orale Fläche. Der Nagezahn wächst während des gesamten Lebens der Ratte, so daß Veränderungen im Mineralstoffwechsel durch Störungen im Wachstum oder Verkalkungsprozeß signalisiert und dokumentiert werden können (siehe auch Kap. 3.1.6).

3.1.5.1 Schmelz

Die Theorien über die Schmelzgenese lassen sich nach CONNE und BAUME (1970) in drei Gruppen zusammenfassen:
1. Die primäre Matrixentwicklung und sekundäre Mineralisation, gleich Verkalkung "en masse".
2. Die Mineralisation parallel zur Matrixentwicklung.
3. Die Mischtheorie.

Die erste Theorie geht davon aus, daß es zuerst zu einer Ausscheidung einer organischen Matrix durch die Ameloblasten und in einem zweiten Schritt zur Mineralisation der komplett ausgebildeten Matrix kommt (von BEUST, 1928). Die zweite Theorie sieht ein kontinuierlich fortschreitendes Zusammenspiel der Matrix-

differenzierung und der Mineralisation, die also beide gleichzeitig an einem Schmelzprisma zu beobachten sind (FEARNHEAD, 1960). Die dritte Theorie besagt, daß es in einem ersten Abschnitt der Nagezahnentwicklung primär zu einer Matrixentwicklung und erst sekundär zur Mineralisation kommt, in der zweiten Phase laufen beide Vorgänge dann parallel (SUGA u. GUSTAFSON, 1963).
Die Schmelzmatrix besteht aus einem dreidimensionalen Netz organischer Fasern, wahrscheinlich Keratin (EASTOE, 1963; PAUTARD, 1963; HÖHLING, 1966; SCHUMACHER-SCHMIDT, 1972), eingebettet in eine Grundsubstanz aus Mukoproteinen (FRANK u. SOGNNAES, 1960). Die Mineralisation beginnt entlang der Längsfibrillen in kleinen Kristallisationszentren, die später verschmelzen. Die Kristalle nehmen dann die Form von hexagonalen Prismen an (NYLEN, EANES u. OMNELL, 1963). Für das Wachstum der Kristalle geben FRANK und SOGNNAES(1960) sowie RÖNNHOLM (1962) die Fusion von separaten Kristallen an, während NYLEN, EANES und OMNELL (1963) es für wahrscheinlicher halten, daß das Kristallwachstum aus der Addition einzelner Moleküle resultiert.
Histologisch gliedert sich der Schmelz der Nagezähne in eine vier Fünftel umfassende innere Schmelzschicht und eine ein Fünftel umfassende äußere Schicht. In der inneren Schmelzschicht durchweben sich die Prismen, während sie in der äußeren parallel zueinander verlaufen (WATSON u. AVERY, 1954). FRANK und SOGNNAES (1960) sehen in der äußeren Schmelzschicht keine Prismen sondern eine Aggregation parallel gelagerter Apatitkristalle. In einer Studie über die äußere Schmelzschicht kommen HALSE und SELVIG (1974) zu dem Ergebnis, daß es nach vollständiger Reifung des Schmelzes in der äußersten Schmelzregion zu einer Rückresorbtion des Calciums durch die Ameloblasten kommt und im gleichen Maße zu einer Einlagerung von Eisen, was zu der typischen orangeroten Färbung des Nagezahnes der Ratte führt.

3.1.5.2 Dentin

Die Bildung der Zahnhartsubstanzen beginnt immer mit der Ablagerung des Dentins. Entlang des Schmelzorgans auf der lingualen Seite und der Hertwig'schen Wurzelscheide auf der approximalen und oralen Seite differenzieren sich aus dem mesenchymalen Gewebe der primitiven Pulpa die Odontoblasten. Dabei dienen die erstgenannten Strukturen als Leitschienen. Allmählich ziehen sich die Odontoblasten von der Grenzmembran zurück. Sie bilden nun in Richtung der Zahnoberfläche einen Fortsatz (Tomes-Faser), in denen sich zahlreiche Mikrovesikel sowie einige Mitochondrien befinden (ORBAN, 1949). Im Zwischenraum zur Grenzmembran erscheint eine Anhäufung von Fasern mit einem Durchmesser von 250 Å und einer für Kollagen typischen Querbänderung. Zwischen den Fibrillen befindet sich eine organisch amorphe Substanz aus Mukopolysacchariden. Fibrillen und Grundsubstanz bilden das Prädentin (LENTZ, 1959). Sobald sich das Prädentin weiter ausdehnt, verkalkt diese Dentinschicht (NYLEN und SCOTT, 1958). Eine ähnliche Zwischenphase aus amorphem Material zwischen fibrillärem Prädentin und mineralisiertem kristallinen Dentin ist in späteren Stadien der Dentinogenese nicht mehr zu erkennen. Diese Fortsätze der Odontoblasten werden im weiteren Verlauf vom Dentin umscheidet und bilden so die Dentinkanälchen.
Als gewichtigsten Unterschied der Histologie des Dentins der Nagezähne zum Dentin anderer Säuger ist das Fehlen einer stärker mineralisierten peritubulären Dentinregion zu nennen, wie sie zum Beispiel beim Menschen zu finden ist (FRANK u. NALBANDIAN, 1963; BRADFORD, 1967). Durch die Form der Dentinkanälchen ist eine histologische Unterscheidung zwischen dem schmelzbedeckten und dem zementbedeckten Dentin möglich (ADDISON u. APPLETON, 1915): Die Kanälchen im Dentin, das mit Schmelz bedeckt ist, laufen regelmäßig parallel nebeneinander her und senden dabei nur sehr feine Verzweigungen aus. Anders das mit Zement bedeckte Dentin: Hier sind die Kanäle mehr gekrümmt und unregelmäßig, wobei diese Unregelmäßigkeit hauptsächlich auf eine Gabelung des Kanals in zwei im Durchmesser fast gleich weite Ausläufer zurückzuführen ist, von denen weitere Abzweigungen ausgehen, die jedoch gröber sind als die im labialen Anteil des Dentins. Zur Zahnoberfläche

hin verzweigen sich die Kanäle vor der Dentin-Schmelz- bzw. Zement-Grenze in zahlreiche feine Dentinkanälchen. Aufgrund der geringeren Durchmesser der Dentinkanälchen hinterläßt das Dentin in diesem Bereich einen homogenen Eindruck.

3.1.5.3 Zement

Da der Zement der Nagezähne der Ratte aufgrund seiner geringen Stärke von nur 3 - 4 µm bei den in dieser Arbeit angewandten Methoden einer Untersuchung nicht zugänglich ist und da seine Mineralisation ähnlich der des Dentins verläuft, kann hier auf eine genaue Beschreibung verzichtet werden.

3.1.6 Veränderungen der Zahnhartsubstanzen

3.1.6.1 Veränderungen ausgewachsener Zähne

Die vollständig entwickelten Zahnhartsubstanzen sind in ihrer chemischen Zusammensetzung gegenüber endogenen Irritationen praktisch inert. Selbst bei massiven Mangelzuständen wurde bisher in keinem einzigen Fall eine Mobilisierung von Calcium oder Phosphor aus den Zähnen beobachtet (NAUJOKS, 1968). Eine Ausnahme bilden die äußersten Schichten des Schmelzes, bei denen eine Beeinflussung durch Umwelteinwirkungen möglich ist. Im Rahmen der Erforschung der Karies, die die wohl tiefgreifendsten Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung der voll ausgebildeten Zähne verursacht, spielen diese Umweltsubstanzen eine große Rolle. Da es sich bei der Karies um einen multifaktoriellen Prozeß handelt, seien in diesem Kapitel nur die Stoffe erwähnt, die sich durch ihre Wirkung speziell auf die Zahnhartsubstanzen als Karies fördernd oder hemmend zu erkennen geben. Am bekanntesten ist die Wirkung von Fluor als karieshemmendes Mittel, wobei es zu einer Anreicherung des Fluors in den äußersten Schmelzschichten kommt (MILLER, 1938; DEAN, 1938; HOTZ, 1972). Als

Karies förderndes Mittel ist z.B. Blei (HAIMOVICI et al, 1970; SCHULZ et al, 1976) zu nennen oder Säuren wie Zitronensäure (MC CLURE u. BEATTY, 1945). Eine Übersicht gibt SALERWEIN (1974).

3.1.6.2 Veränderungen wachsender Zähne

Wesentlich größer ist die Zahl der Stoffe, die eine Veränderung während der Entwicklung der Zahnhartsubstanzen hervorrufen. Bei der Erforschung dieser Wirkungen spielt der Nagezahn eine entscheidende Rolle, da in ihm durch sein permanentes Wachstum über das gesamte Leben alle Stadien der Entwicklung repräsentiert sind. Eine Wirkung auf die Mineralisation der sich entwickelnden Zahnsubstanzen geht einmal von verschiedenen Vitaminen aus, ferner von verschiedenen Salzen und Ionen, von Hormonen und Medikamenten (SCHOLZ u. MASSLER, 1949). Vier hauptsächliche Wirkungsmechanismen sind möglich (EISENMANN u. YAEGER, 1969):

1. eine unspezifische Wirkung,
2. eine Interferenz mit spezifischen Zellen oder Fermenten,
3. die Wirkung auf Kernbildung, Wachstum und Struktur der Kristalle,
4. andere Faktoren, wie Veränderungen im Calcium- und Phosphatspiegel des Serums.

Veränderungen durch Vitamine

Vitamin-A-Mangel bei der Ratte produziert verschiedene Veränderungen der Proliferations-, Differenzierungs- und Appositionsphase im Wachstum der Zähne. Es kommt zu Veränderungen in der Odontoblastenschicht und ein atypisches Dentin wird produziert. Dabei wird auf der labialen Seite vermehrt Dentin abgeschieden, während auf der oralen Seite umso weniger Dentin abgelagert wird. Ebenso ist der Schmelz hypoplastisch (CONNE, KÖRNER u. BAUME, 1965; CONNE u. BAUME, 1968). Die Verkalkung ist nur leicht gestört im Verhältnis zu den deutlichen Veränderungen im Wachstum. SMITH und LANTZ (1933) fanden einen geringeren Prozentsatz an Asche, jedoch einen höheren Calciumanteil in der Asche. Vitamin A ist also wesentlich für die hartsubstanzbildenden Zellen (WOL-

BACH u. HOVE, 1933; MELLANBY, 1939).
Anders als bei Vitamin-A-Mangel ist die Mineralisation bei Vitamin-D-Mangel stärker gestört als das Wachstum. Im Dentin sind 3 Zonen zu unterscheiden: Ein weites Prädentin, eine Zone mit unvollständiger interglobulärer Verkalkung und normal verkalktes Dentin (ERDHEIM, 1914). Auf einen Vitamin-D-Mangel sind auch die Zahnveränderungen bei der Rachitis zurückzuführen. Bei einer Überdosis Vitamin D kommt es zu einer zweigeteilten Reaktion. Zuerst entsteht ein minderverkalktes Dentin parallel zum Anstieg des Calciumgehaltes im Serum. Und anschließend entsteht eine hypercalcifizierte Schicht im Dentin, die parallel läuft zur Rückkehr des Calciumgehaltes zu normalen Werten (SCHOUR u. HAM, 1934).

Veränderungen durch Hormone
Bei den Hormonen zeigt ein Mangel an Wachstumshormon nach Hypophysektomie besonders schwerwiegende Veränderungen. Es kommt zu einem völligen Stillstand der Eruptionsbewegungen (SCHOUR u. van DYKE, 1932), während das appositionelle Wachstum an der Basis bestehen bleibt, wenn auch vermindert. Durch diese Disproportion zwischen Wachstum und Durchbruch kommt es zu einem akkordeonartigen Ineinanderschieben der neu geformten und unverkalkten Dentin- und Schmelzschichten an der Basis. Zusätzlich kommt es durch die Dentinabscheidung zu einer Verengung des Pulpencavum, das vollständig obliterieren kann. Ferner ist ein Anstieg der Zementdicke von 4 auf 16 µm zu beobachten. Das Dentin zeigt eine Hypercalcifikation, und im Prädentin sind einzelne, isolierte Calciumanhäufungen zu entdecken.
Schlegel et al (1968) wiesen nach, daß es bei Kastration und gleichzeitiger Cortisonbehandlung zu einem gesteigerten Calcium-Einbau im Bereich der oberen Nagezähne kommt.
Zahnveränderungen bei der Ratte aufgrund hormoneller Störungen finden sich weiter bei Hyperparathydroidismus (SCHOUR, TWEEDY u. MC JUNKIN, 1934), Hypothyroidismus (SCHOUR u. MASSLER, 1949), Hyperthyroidismus (HOSKINS, 1927-1928), Nebenniereninsuffizienz (SCHOUR u. ROGOFF, 1936) sowie nach Injektion von Thymusextrakt (ROWNTREE, 1934).

Veränderungen bei parathyreopriver Tetanie

Besonders sei hier auf die Wirkung einer Parathyreoidektomie eingegangen (PREISWERK-MAGGI, 1915; ERDHEIM, 1914; HIROISHI, 1924).

Nach einer Parathyreoidektomie kommt es bei Ratten erstens zu einer relativ wenig heftigen, chronisch verlaufenden Tetanie, deren Symptome sich nach einiger Zeit zurückbilden. Zweitens bildet sich eine Katarakt aus, die nach anfänglichem Wachstum schnell zum Stillstand kommt. Die dritte Folge sind Zahnveränderungen: Fehlende Verkalkung des Dentins sowie Schmelzhypoplasien. Die Alterationen reichen von leichten farblichen Veränderungen des Schmelzes teils durchgehend, teils alternierend mit gesunden Abschnitten bis zur Fraktur der Zähne. Da der Nagezahn der Ratte über das gesamte Leben wächst, besteht hier die Möglichkeit einer Regeneration.

Veränderungen durch Ionen und Salze

Die Zahl der Ionen und Salze, die eine Irritation der Zähne hervorrufen können, ist beträchtlich. EISENMANN und YAEGER (1969) geben einen guten Überblick. Seit langem ist bekannt, daß Natriumfluorid zu diesen Substanzen gehört (SCHOUR u. SMITH, 1934, 1935; YAEGER, 1963; OSMANSKI u. YAEGER, 1964; MEFFERT u. KÄMMERER, 1973). Nach einer intraperitonealen Injektion von Natriumfluorid kommt es zu einer Schädigung der Ameloblasten. Nach 24 Stunden zeigt sich sowohl im Schmelz als auch im Dentin eine hypocalcifizierte Schicht. Hier kommt es möglicherweise zu einer stärkeren Ablagerung von Calciumfluoriden anstelle anderer Calciumsalze. Als zweiter Effekt bei einer akuten Fluorosis erscheint ähnlich wie bei Vitamin D Überdosis eine hypercalcifizierte Schicht. Die erste sichtbare Veränderung der Nagezähne ist ein Verlust der Pigmentierung.

Bei einer chronischen Fluorosis verbleibt die Schmelzmatrix in einem unreifen, säureresistenten Stadium, während bei der akuten Fluorosis bei in Säure entkalkten Schnitten die Matrix völlig fehlt (TODA u. van HUYSEN, 1966). Später kommt es zu hypoplastischen Effekten. Im Dentin kommt es zu vaskulären Einschlüssen.

Zähne und Knochen haben einen geringeren Aschegehalt, jedoch einen höheren Calciumgehalt (SMITH u. LANTZ, 1933). Darüber hinaus führt Natriumfluorid zu einer verminderten Wachstumsrate und zu einer verminderten Calcium- und Phosphatretention (SMITH, 1934). Als weitere Substanzen sind noch zu nennen: Strontiumchlorid (WEINMANN, 1942; IRVING u. WEINMANN, 1948), sowie Strontium (YAEGER, 1966; JOHNSON u. SINGER, 1967), hier besteht ein umgekehrt proportionales Verhältnis von Strontium zu Calcium bei Einbau in die Matrix, sowie Blei (HAIMOVICI et al, 1970, RAPPAPORT et al, 1975), Selen (HADJIMARKOS, 1970) sowie Zink (BIRD u. THOMAS, 1963) aber auch Oxalat und Citrat (EISENMANN u. YAEGER, 1969).

Veränderungen durch Medikamente

Die Chemotherapeutika Tetracyclin und Oxytetracyclin führen zu einer signifikanten Verringerung der Elemente Calcium und Magnesium im Dentin, jedoch nicht im Schmelz (ANATOLOWSKA, HERMANSKY u. SKALSKA, 1975). Die mit Tetracyclin behandelten Zahngewebe heben sich durch ihre Löslichkeit und spezifischen Dichte von den normalen Zahngeweben ab (BAKER, 1972). Da es auch beim Menschen zu einer irreversiblen Gelbfärbung und Schmelzhypoplasien kommt, sind diese Chemotherapeutika während der Mineralisationsphase des Milch- und des bleibenden Gebisses kontraindiziert.

3.1.6.3 Wirkungsmechanismen

Unspezifische Wirkung

Eine unspezifische Wirkung auf die Entwicklung der Zahnsubstanzen bedeutet, daß neben Schmelz und Dentin auch die Gewichtszunahme im gleichen Maße betroffen ist. Es liegt also eine generalisierende Wirkung vor. Dies findet sich vor allem bei traumatischen Veränderungen in Folge eines chirurgischen Eingriffs in das Hormonsystem, weshalb auch der Begriff "calciumtraumatische

Wirkung" geprägt wurde. Jedoch zeigen auch Einzelgaben bestimmter Ionen wie Mangan, Antimon und Rubidium (EISENMANN u. YAEGER, 1969) oder chronische erhöhte Natrium-Fluorid-Applikation (SMITH, 1934) die gleiche Wirkung.

Direkte Wirkung auf odontogene Zellen, die Matrix oder Enzyme

Als weitere Wirkungsmöglichkeit ist eine direkte Wirkung auf die odontogenen Zellen, die Matrix oder auf bestimmte Enzyme möglich. So verändert eine Hypovitaminosis A speziell die odontogenen Zellen, während Röntgenstrahlen die dentinbildenden Odontoblasten schädigen.

Injektionen von Strontium führen zu einer Disorganisation und Degeneration der Ameloblasten, während Veränderungen der Odontoblasten hierbei bisher nicht beobachtet wurden (WEINMANN, 1942). Allerdings ist eine Veränderung in der Dentinmatrix zu beobachten, so daß es möglich ist, daß die Schmelzstörungen durch einen Einfluß auf die Ameloblasten auftreten, während die Dentinformation durch einen anderen, noch nicht bekannten Mechanismus gestört wird. Möglicherweise bewirkt Strontium eine Auflösung der Matrix und eine Umorientierung der Kollagenfibrillen (GRADY u. YAEGER, 1965).

Beim Einbau in die mineralisierenden Zahngewebe bilden die Tetracyclinantibiotika einen Chelatkomplex mit Calcium, gleichzeitig reagieren sie auch mit den sauren Mukopolysacchariden und Proteinen der organischen Matrix (BACHRA u. vander MEULEN-van HARSKAMP, 1973). Von einigen Stoffen, die Veränderungen der Zahnbildung hervorrufen, ist bekannt, daß sie Enzyminhibitoren sind. So hemmt z.B. Beryllium die alkalische Phosphatase (EATON u. MOSS, 1967) und Oxalat die Enzyme der aneroben Glykolyse. Es ist also möglich, daß auch hier die irritierende Wirkung auf der Hemmung wesentlicher Enzyme beruht.

Wirkung auf Kernbildung, Wachstum und Struktur der Kristalle

Bei einigen Substanzen scheint eine störende Wirkung auf Kernbildung, Wachstum und Struktur der Kristalle möglich. So ist Chrom in der Lage in in-vitro-Versuchen die Mineralisation zu verhin-

dern (BIRD u. THOMAS, 1963). Bei Lithium ist ein eins zu eins Austausch mit Calcium an der Oberfläche synthetischer Apatitkristalle möglich (PAK u. BARTTER, 1967). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten eine Veränderung der Orientierung der Kristallite durch Fluor (HELMCKE, 1955) im Schmelz und eine verminderte Kristallzahl im Dentin (YAEGER, 1963).

Weitere Wirkungsmöglichkeiten

Neben den bisher genannten sind weitere Wirkungsmöglichkeiten denkbar. So ist z.B. Zink in der Lage eine Veränderung in der Calcium- und Phosphatabsorption und -exkretion zu verursachen (STEWART u. MAGES, 1964). Es ist also denkbar, daß Zink so stark in den Calcium- und Phosphathaushalt eingreift, daß es nachfolgend zu einer hypomineralisierenden Schicht kommt, ähnlich wie dies bei ein Vitamin-D-Überdosierung beobachtet wurde (SCHOUR u. HAM, 1934).

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Auch bei dieser Versuchsreihe wurden weibliche Sprague-Dawley-Ratten der Süddeutschen Versuchstierfarm, Tuttlingen, eingesetzt. Untergebracht waren die Tiere zu zweit oder zu dritt in einem Makrolonkäfig. Zur Unterscheidung waren die Tiere am Schwanzende mit wasserunlöslicher, farbiger Tusche markiert. Der Käfig war mit Holzspänen ausgefüttert; als Futter standen Altromin^{R} Standardfutter (pelletiert) und Wasser ad libitum zu Verfügung

3.2.2 Versuchsaufbau und Dosierung

Zum besseren Verständnis des in diesem Abschnitt Beschriebenen sei auf Abbildung 1 verwiesen.

Die Untersuchung der Wirkung von 2-Methoxyäthanol kann in 4 Ab-

schnitte unterteilt werden, wenn man die Kontrollgruppe mit oraler Applikation der Lösungsmittel für 2,3,5,6-Tetrachloranilin aus Teil eins der vorliegenden Arbeit mit hinzurechnet.

Versuch I umfaßt die VersuchsgruppeI4 mit 8 Tieren, der eine Mischung von sowohl 2-Methoxyäthanol (0,75 g/kg KG) als auch Tween-80 (0,75 g/kg KG) in Aqua bidest mit der Schlundsonde appliziert wurde. Der Versuch dauerte insgesamt 71 Tage. Bei diesem Versuch konnte zum ersten Mal das Auftreten von Linsen- und Zahnveränderungen beobachtet werden, wie bereits in Abschnitt 2.2.2 erwähnt wird.

Als Kontrollgruppe blieb in diesem Versuch die Gruppe I 5 unbehandelt. Zur besseren Übersicht sind die zum Versuch I gehörenden Gruppen noch einmal zusammengestellt:

Gruppe I 4 : 2-Methoxyäthanol (0,75 g/kg KG)
+ Tween-80 (0,75 g/kg KG)

Gruppe I 5 : Leergruppe (unbehandelt)

In Versuch III sollte geprüft werden welcher Lösungsmittelbestandteil die kataraktogene und die Zahnbildung störende Wirkung besitzt. Auch hierüber war bereits unter 2.2.2 kurz berichtet worden. Es wurden 2 Versuchsgruppen zu je 10 Tieren untersucht. Eine erhielt Tween-80 mittels der Schlundsonde (Gruppe III 1), die andere 2-Methoxyäthanol (Gruppe III 2), wobei letztere nochmals unterteilt wurde: 4 Tiere erhielten eine 12,5 %ige Lösung von 2-Methoxyäthanol (Gruppe III 2a) und 6 Tiere eine 25 %ige Lösung (Gruppe III 2b). Dieser Versuchsabschnitt dauerte 92 Tage.

Gruppe III 1 : Tween-80 (0,75 g/kg KG)
Gruppe III 2a : 2-Methoxyäthanol (0,375 g/kg KG)
Gruppe III 2b : 2-Methoxyäthanol (0,75 g/kg KG)

Versuch IV diente der Frage, ob zwischen 2-Methoxyäthanol und Tween-80 eine wechselseitige Beeinflussung stattfindet und ab welcher Dosis mit Linsen- und Zahnveränderungen zu rechnen ist. Er bestand aus 3 großen Versuchsgruppen und dauerte insgesamt 49 Tage. Die Gruppen IV 1 und IV 2 waren in jeweils 4 Untergruppen unterteilt, die 2-Methoxyäthanol allein (Gruppe IV 1) oder gemischt mit Tween-80 in verschiedenen Konzentrationen (Gruppe

IV 2) über die Schlundsonde erhielten. In Gruppe IV 3 blieben ebenfalls 5 Tiere als Leerkontrolle ohne Behandlung.

Gruppe IV 1a : 2-Methoxyäthanol (0,27 g/kg KG)
Gruppe IV 1b : " (0,54 g/kg KG)
Gruppe IV 1c : " (1,11 g/kg KG)
Gruppe IV 1d : " (2,25 g/kg KG)

Gruppe IV 2a : 2-Methoxyäthanol (0,27 g/kg KG) + Tween-80 (0,75 g/kg KG)
Gruppe IV 2b : 2-Methoxyäthanol (0,54 g/kg KG) + Tween-80 (0,75 g/kg KG)
Gruppe IV 2c : 2-Methoxyäthanol (1,11 g/kg KG) + Tween-80 (0,75 g/kg KG)
Gruppe IV 2d : 2-Methoxyäthanol (2,25 g/kg KG) + Tween-80 (0,75 g/kg KG)

Gruppe IV 3 : Leergruppe (unbehandelt)

Mit Versuch V sollten die bisher gewonnenen Ergebnisse überprüft werden sowie Material für weitere Untersuchungen bereitgestellt werden. Der Versuch bestand aus 2 Gruppen zu jeweils 20 Tieren. Gruppe V 1 wurde eine Mischung aus Tween-80 und 2-Methoxyäthanol mit der Schlundsonde appliziert. Gruppe V 2 blieb als Leerkontrolle unbehandelt. Dieser abschließende Versuch dauerte 30 Tage.

Gruppe V 1 : 2-Methoxyäthanol (0,75 g/kg KG) + Tween-80 (0,75 g/kg KG)
Gruppe V 2 : Leergruppe (unbehandelt)

3.2.3 Herstellung der Lösungen

Entsprechend den unter Ziffer 3.2.2 für die einzelnen Gruppen angegebenen Mengen wurden aus 2-Methoxyäthanol und Tween-80 verschieden konzentrierte Lösungen hergestellt:

0,27 g/kg KG = 9 %ige Lösung 2-Methoxyäthanol
0,375 g/kg KG = 12,5 %ige Lösung 2-Methoxyäthanol
0,54 g/kg KG = 18 %ige Lösung 2-Methoxyäthanol

0,75 g/kg KG = 25 %ige Lösung 2-Methoxyäthanol
1,11 g/kg KG = 37 %ige " "
2,25 g/kg KG = 75 %ige " "

Die Dosierung von Tween-80 betrug in allen Fällen
0,75 g/kg KG = 25 %ige Lösung Tween-80.

Die Herstellung der Lösungen sei an einem Beispiel erklärt: 75 g 2-Methoxyäthanol und 25 g Tween-80 werden gemischt und mit 150 g H_2O ergänzt, so daß eine Lösung mit 25 % 2-Methoxyäthanol und 25 % Tween-80 entsteht. Die Konzentrationen sind so gewählt, daß bei einem Durchschnittgewicht der Tiere von 65 g bei Versuchsbeginn jedes Tier 0,2 ml Lösung erhielt. Die applizierte Menge wurde dann während des Versuchs dem veränderten Körpergewicht angepaßt.

3.2.4 Voruntersuchung

Die Voruntersuchung bestand neben der ophthalmologischen Untersuchung aus einer Inspektion der Nagezähne und der angrenzenden Gewebe. Als Hilfsmittel dienten ein Mundspiegel und eine zahnärztliche Sonde. Ferner wurde das Gewicht der Tiere ermittelt. Da bei keinem der Tiere eine Veränderung von pathologischem Wert bestand, konnten alle gelieferten Tiere für den Versuch eingesetzt werden.

3.2.5 Versuchsdurchführung

3.2.5.1 Körpergewichte

Das Gewicht der Tiere wurde wöchentlich mit einer Balkenwaage bestimmt.

3.2.5.2 Klinische Untersuchung der Nagezähne

Aufgrund der Beobachtungen der Zahnbildungsstörungen aus den Versuchsgruppen I 4 und III 2 konnte eine Graduierung der Veränderungen erstellt werden. Zur Klassifizierung wurde nur der Befund an den mit Schmelz bedeckten Vorderflächen der Nagezähne herangezogen, da an den mit Zement bedeckten Flächen keinerlei Irritationen entdeckt werden konnten. Als Kriterien zur Beschreibung der Veränderungen dienten die Farbe der Nagezähne, die Transparenz des Schmelzes und die Konsistenz. Die Konsistenz wurde mit einer zahnärztlichen Sonde geprüft. Bei der Klassifizierung konnten 7 verschiedene Befundgruppen unterschieden werden (vgl. 3.3.2).

3.2.5.3 Röntgenuntersuchung der Nagezähne

Die zusammen mit dem Kieferknochen herauspräparierten Nagezähne wurden mit einer Dentalröntgenröhre (Fa. Oralix) geröntgt. Als Film diente ein normaler Zahnfilm(Fa. Gevaert) im Format 4 x 3 cm. Der Film-Focus-Abstand betrug ca. 10 cm; die Belichtungszeit erwies sich mit $<0{,}2$ sec. als optimal.

3.2.5.4 Calciumbestimmungen bei Nagezähnen, Femur und Serum

Nachdem die Ratten in Äthernarkose dekapitiert worden waren, wurden die Nagezähne aus den Kiefern herauspräpariert und sofort in 10 %ige Formollösung fixiert. Die 4 Nagezähne jeweils eines Tieres wurden gepoolt. Einige Tage später wurden die Zähne bei 50^{o}C im Trockenschrank für 4 Stunden getrocknet und anschließend mit dem Skalpell und einer Messingdrahtbürste von etwa noch anhaftenden Knochenresten gereinigt. Danach wurden die Zähne auf einer Analysenwaage (Fa. Mettler) gewogen. Zum Entkalken wurden die Zähne für 120 Stunden in etwa 10 ml 5 %ige Salpetersäure bei

38°C inkubiert. Mit Hilfe eines Zahnröntgenfilmes wurde stichprobenartig überprüft, ob eine vollständige Entkalkung erreicht war. Der Calciumgehalt der Salpetersäure wurde durch Titration bestimmt. Die für die Titration notwendigen Reagenzien waren:

Titrationsmittel : 0,01 M EDTA-Lösung (Titriplex^{R} III, Fa. Merck, Darmstadt).

Indikator : Calcein-Mischindikator-Verreibung bestehend aus: Calcein (0,2 g 2,7-Bis(bis(carboxylmethyl)-aminomethyl)-fluorescein), Thymolphthalein (0,12 g), Kaliumnitrat (20 g).
Farbumschlag: Am Titrationspunkt verschwindet die grüne Fluoreszenz der Lösung und es tritt eine violett-rosa Färbung auf.

Milieu : Durch Zugabe von 1 n Natriumhydroxydlösung wurde die Lösung deutlich alkalisch gemacht.

Titriert wurde mit einer Tropfhahnbürette (Graduierung: 0,01 ml). Die Titration verlief in folgenden Schritten:

1. Die calciumhaltige salpetersaure Lösung wurde auf 100 ml mit Aqua bidest aufgefüllt.
2. Hiervon wurden 10 ml abpipettiert, in einen Titrierkolben gefüllt, mit 1 n Natriumhydroxyd deutlich alkalisch gemacht und mit 90 ml Aqua bidest aufgefüllt.
3. Zugabe von etwa 20 mg Calcein-Mischindikator-Verreibung.
4. Titration mit 0,01 M Titriplex^{R} III-Lösung. Zur gleichmäßigen Durchmischung wurde mit einem Magnetrührer gerührt.

Jede Probe wurde dreimal bestimmt und das arithmethische Mittel errechnet.

Da 1 ml 0,01 M Titriplex-Lösung 0,4008 mg Calcium bindet, ergibt sich folgende Berechnungsformel:

$$\frac{\text{ml EDTA} \times 0{,}4008 \times 10}{\text{mg Zahneinwaage}} \times 100 = \text{Gew. \% Calcium}$$

Femur

Zu Calciumbestimmungen in Knochen wurde der rechte Femur nach dem Dekapitieren herauspräpariert. Zur Reinigung wurden die Knochen für 2 Wochen in Aqua bidest gelegt. Danach konnten die anhaftenden Sehnen und Muskelreste leicht mit dem Skalpell und einer

Messingdrahtbürste entfernt werden. Anschließend wurden sie bei 50°C im Trockenschrank für 8 Stunden getrocknet. Das Gewicht wurde wie bei den Nagezähnen mit einer Analysenwaage (Fa. Mettler) bestimmt. Um eine vollständige Entkalkung zu erreichen, wurden die Knochen für 14 Tage in ca. 10 ml 5 %ige Salpetersäure bei 38°C gelegt. Röntgenstichproben am Ende der Zeit überprüften die vollständige Entkalkung. Die Titration verlief unter den gleichen Bedingungen wie bei den Zähnen. Wegen der etwa fünffach größeren Einwaage wurden nur jeweils 2 ml statt 10 ml der salpetersauren Lösung titriert, um im Optimalbereich der Methode zu arbeiten. Daraus ergibt sich folgende veränderte Berechnungsformel:

$$\frac{\text{ml EDTA} \times 0{,}4008 \times 50}{\text{mg Knocheneinwaage}} \times 100 = \text{Gew. \% Calcium}$$

Serum

Serum wurde aus dem Blut der dekapitierten Tiere durch Zentrifugieren gewonnen. Der Serum-Calcium-Gehalt wurde mittels eines Fluorimeters (Fa. Corning) bestimmt. Fluorimeter messen die emittierte Fluoreszenz angeregter Moleküle, deren Intensität innerhalb bestimmter Grenzen proportional der Konzentration der fluoreszierenden Substanz in der Lösung ist. Die Wellenlänge der einstrahlenden Lichtquelle liegt zwischen 300 - 500 µm. Durch einen Primärfilter wird diese Strahlung isoliert , die zu messende Fluoreszenz-Strahlung durch einen senkrecht dazu angeordneten Sekundärfilter. Calcein ist eine fluoreszierende Substanz, die mit Calciumionen im alkalischen Milieu einen nicht dissoziierten Komplex bildet. Das analytische Prinzip des Corning-Fluorimeters beruht auf dem Nachlassen der Fluoreszenz durch die Chelat-Bildung des Calciums mit dem Titrationsmittel EGTA (Äthylenglykol-bis-aminoäthyl-äther-V-N-tetraacetat).
Die Titration stoppt, sobald das EGTA alle Calciumionen als Chelate gebunden hat. Dadurch ist die Intensität der Fluoreszenz auf das Niveau zurückgefallen, das bei Beginn vorlag. Ausgelöst wird diese Grundfluoreszenz durch eine definierte Menge Calcium, die zusammen mit dem Calcein zugegeben wird. Das Gerät findet diesen Punkt automatisch wieder und zeigt dann die Konzentration des Calciums digital an.

Die Kontrolle erfolgte mit dem Kontrollserum Precinorm S der Fa. Boehringer, Mannheim, Sollwert: 4,96 mval/l, Vertrauensbereich 4,46 - 5,46 mval/l. Die Präzision in der Serie wurde durch 20 Bestimmungen des gleichen Kontrollserums Precinorm S untersucht. Die Auswertung ergab einen Mittelwert von 4,96 mval Ca^{2+}/l. Die Standardabweichung betrug 0,04 mval/l und der Variationskoeffizient 0,81 %. Die Richtigkeit wurde kontinuierlich durch eine tägliche Doppelbestimmung des Kontrollserums Precinorm S geprüft. Die Auswertung ergab einen Mittelwert von 5,01 mval Ca^{2+}/l. Die Standardabweichung berechnet aus einem Monatsverlauf betrug 0,04 mval/l und der Variationskoeffizient 0,80 %.

3.2.5.5 Herstellung der histologischen Präparate

Die unteren Nagezähne der dekapitierten Tiere wurden mitsamt dem Kieferknochen herauspräpariert und sofort in 10 %iger Formollösung fixiert. Dort verblieben sie einige Tage. Anschließend wurden die Präparate in Orthocryl-Kunststoff (Fa. Dentaurum, Pforzheim) eingebettet. Von Hand wurden die Kunststoffblöcke beschliffen bis der Zahn etwa zur Hälfte in der Sagittalebene durchtrennt war. Zunächst wurden die Blöcke mit Sandpapier der Korngröße 80 in absteigender Reihenfolge über die Größen 60 und 36 bis Größe 16 bearbeitet und abschließend auf einem Koruntstein geglättet. Jeweils ein Zahn eines Tieres wurde mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt, der andere Zahn wurde im ursprünglichen Zustand belassen, so daß eine Vergleichsmöglichkeit gegeben war. Durch den Kunststoffblock war eine mikroskopische Betrachtung nur bei Seitenlicht möglich. Typische Befunde wurden fotographisch dokumentiert, dabei kamen nur die mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Präparate zum Einsatz.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Körpergewichte

Es zeigte sich, daß die oral mit 2-Methoxyäthanol behandelten Tiere in allen Fällen eine erheblich gestörte Gewichtszunahme erkennen ließen. Dieser Effekt war in den Versuchen I, III, IV und V (vgl. Abb. 1) deutlich zu erkennen. Als typisches Beispiel ist auf Abbildung 5 der Verlauf in Versuch V dargestellt. Der Effekt war dosisabhängig und wurde durch die zusätzliche Verabreichung von Tween-80 verstärkt. Das ergibt sich deutlich aus den Ergebnissen von Versuch IV, wo es möglich war, den Einfluß von verschiedenen 2-Methoxyäthanol-Dosierungen mit und ohne gleichzeitiger Tween-80-Verabreichung zu testen. Auf Tabelle 12 findet sich eine Zusammenstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen in den 5 bei Versuchsende noch vorhandenen Gruppen. Es läßt sich erkennen, daß in allen 4 behandelten Gruppen das Körpergewicht erheblich unter dem Gewicht der Kontrollgruppe lag. Unter den behandelten Gruppen waren die höher dosierten leichter als die niedrig dosierten und die mit Tween-80 behandelten leichter als die nicht mit Tween-80 behandelten Tiere. Der Unterschied zwischen den Gruppen ist in der Varianzanalyse signifikant ($p<0,01$, Tab. 12), eine Zerlegung der Varianz zwischen den Stichproben mit Hilfe orthogonaler Kontraste (Tab. 11) läßt erkennen, daß neben dem Behandlungseffekt auch der Dosiseffekt und der Effekt einer zusätzlichen Tween-80-Verabreichung signifikant ist (Tab. 12). Die Darstellung aller Gewichtskurven findet sich in der Dissertation KÖSTER (1980).

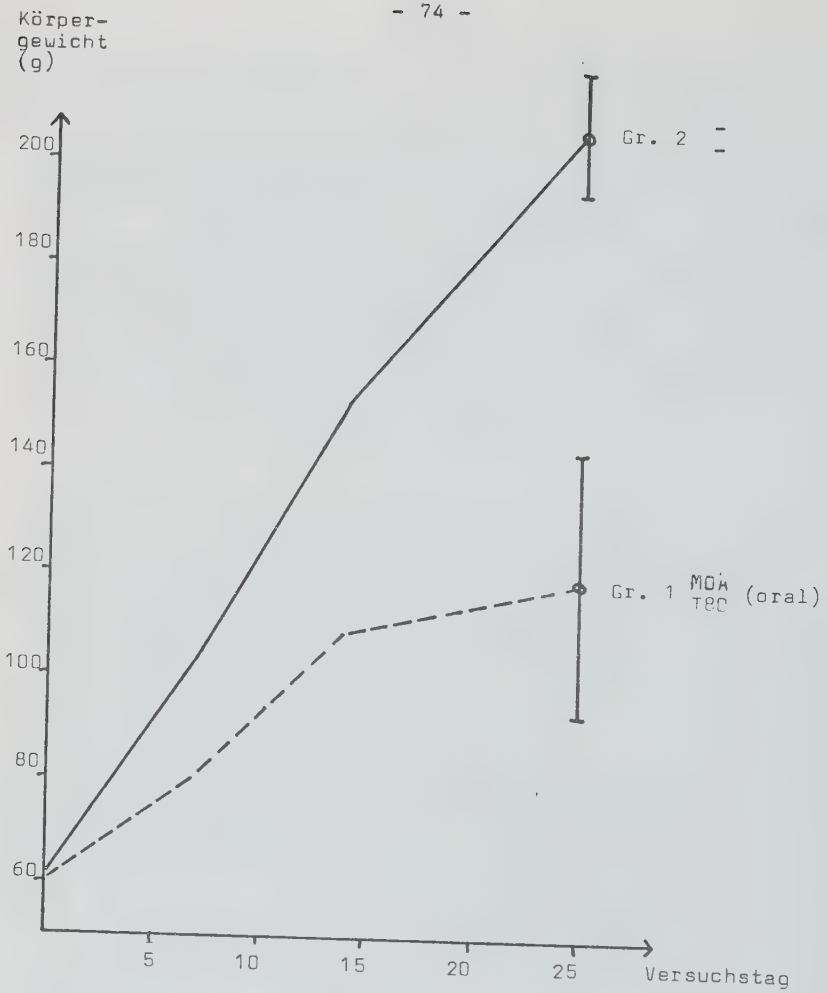


Abb. 6: Graphische Darstellung der Körpergewichte der beiden Gruppen des Versuchs V mit Angabe der Standardabweichung am letzten Versuchstag.

Tabelle 11 : Berechnung von orthogonalen Kontrasten zur Zerlegung der Varianz zwischen den Stichproben in einen Behandlungs-, einen Tween-, einen Dosis- und einen Wechselwirkungseffekt.

Gruppe	Kontrast 1 (Beh.E.)	2 (Tw.E.)	3 (Dos.E.)	4 (Ww.E.)
IV 1a (MOÄ↓)	+	-	+	-
IV 1b (MOÄ↑)	+	-	-	+
IV 2a (MOÄ↓+T80)	+	+	+	+
IV 2b (MOÄ↑+T80)	+	+	-	-
IV 3 Kontr.	-	0	0	0

Tabelle 12 : Statistische Auswertung der Körpergewichte der oral mit MOÄ behandelten Gruppen des vierten Versuchs. Mittelwerttabelle und einfache Varianzanalyse am letzten Versuchstag und Zerlegung der Varianzanalyse in orthogonale Kontraste (Seite 76) nach Tab. 11.

Gruppe:	Mittelwert (g):	Stand.Abw.:	N:
IV 1a	164.00	17.82	5
IV 1b	146.00	17.82	5
IV 2a	155.00	23.80	4
IV 2b	103.75	11.09	4
IV 3	199.00	7.42	5

Varianzanalyse:

Var.Urs.:	SAQ:	FG:	MAQ:	F:	P:
Zwischen	20986.46750	4	5246.61688	19.56	<0,01
Innerhalb	4828.74976	18	268.26387		
Gesamt	25815.21730	22			

Var.Urs.	SAQ:	FG:	MAQ:	F:	P:
Zwischen	20986.46750	4	5246.61688	19.56	
Kontr.1 (Beh.E.)	12004.9396	1		44.75	<0,01
Kontr.2 (Tw.E.)	2918.4028	1		10.88	<0,01
Kontr.3 (Dos.E.)	4834.7222	1		18.02	<0,01
Kontr.4 (Ww.E.)	734.7222	1		2.74	-
Innerhalb	4828.74976	18	268.26387		
Gesamt	25815.21730	22			

3.3.2 Klinische Untersuchung der Nagezähne

Unter Berücksichtigung der Farbe, der Transparenz und der Konsistenz des Schmelzes werden folgende 7 Befundgruppen unterschieden:

Befundgruppe 0:

Normale Nagezähne von rot-brauner Färbung, harter Konsistenz und ungetrübter Transparenz.

Befundgruppe I:

Die Farbe verblaßt von normalen rot-braun zu helleren gelblichen Farbtönen. Die beiden anderen Kriterien sind normal.

Befundgruppe II:

Innerhalb des Schmelzes kommt es zu wolkenartigen Trübungen, so daß die Transparenz verlorengeht. Die Farbe dieser Trübungen ist weiß. Bei Prüfung der Konsistenz dieser Flecken mittels der Sonde sind keine Unterschiede zur normalen Härte des Schmelzes festzustellen.

Befundgruppe III:

Einzelne der in Befundgruppe II beschriebenen Flecken erweichen, so daß die Sondenspitze beim Darüberhinweggleiten hängen bleibt. Diese Konsistenzveränderungen erscheinen immer zuerst am Gingivalsaum und schieben sich dann incisalwärts. Bleiben diese Erweichungen auf eng umschriebene Areale

beschränkt, entspricht dies der Befundgruppe III.

Befundgruppe IV:

Wird durch die in Befundgruppe III beschriebenen Erweichungen nach und nach der größte Teil des Schmelzes erfaßt, ist dies der Befundgruppe IV zuzuordnen. Es entsteht also ein fließender Übergang zwischen den Befundgruppen III und IV.

Befundgruppe V:

Bei den Zähnen in dieser Befundgruppe ist die Veränderung der Konsistenz soweit fortgeschritten, daß es zur Herauslösung von Schmelzbezirken kommt, wahrscheinlich bei der Nahrungsaufnahme, so daß teilweise das darunterliegende Dentin hervortritt. Ebenso zur Gruppe V werden die Zähne gezählt, bei denen es zu einem ungewöhnlich starkem abbrökeln der Incisalkante kommt, während diese normalerweise durch den funktionellen Abrieb mehr abgeschliffen als abgebrochen wird.

Befundgruppe VI:

Die Störungen der Mineralisation sind so tiefgreifend, daß es bei normaler Belastung der Nagezähne zu Frakturen durch Schmelz, Dentin und Zement hindurch kommt.

In Abbildung 7 sind alle Befundgruppen noch einmal nebeneinander dargestellt.

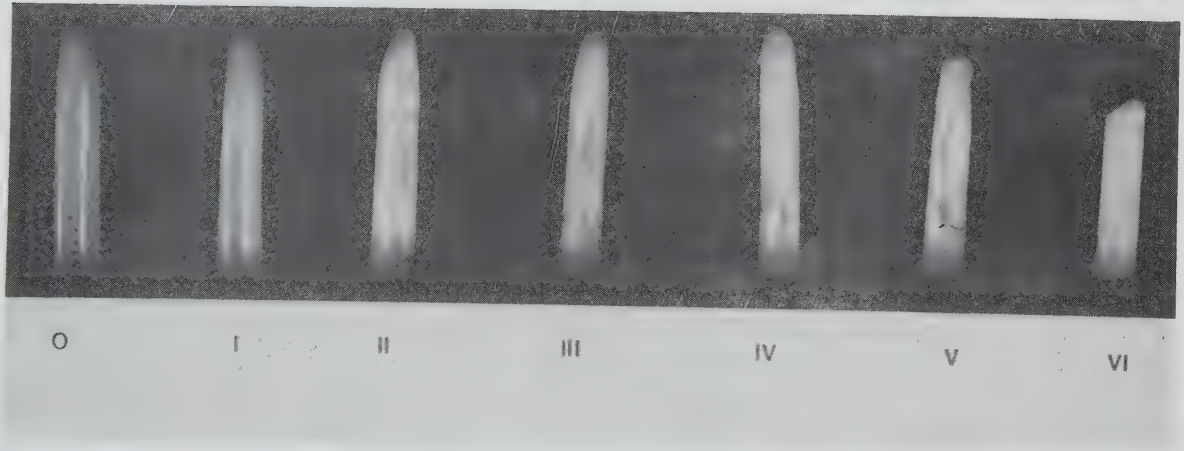


Abb. 7: Gegenüberstellung eines normalen Rattennagezahnes und durch orale Applikation von MOÄ in 6 verschiedenen Abstufungen geschädigte Zähne.
0 ≙ normaler Schmelz; I ≙ verblaßter Schmelz; II ≙ getrübter Schmelz;
III ≙ partiell erweichter Schmelz; IV ≙ generell erweichter Schmelz;
V ≙ frakturierter Schmelz; VI ≙ frakturierter Zahn

Wie bereits unter Punkt 3.2.5.2 erwähnt, dienten die Gruppen I 3 und III 2 zur Erstellung einer Graduierung. Da geplant war, die Tiere der Gruppen IV 1 und IV 2 zum Zeitpunkt der stärksten Veränderungen abzutöten, um bei der chemischen Untersuchung möglichst ausgeprägte Ergebnisse zu erhalten, sei hier noch kurz auf die weitere Entwicklung der Nagezähne eingegangen, wie sie in den Versuchsgruppen I 3 und III 2 zu beobachten war: Sobald der für das jeweilige Tier individuell verschiedene Höhepunkt der Veränderungen erreicht war, das entsprach etwa den späteren Befundgruppen III bis VI, blieb dieses Bild für mehrere Tage konstant. Allmählich bildeten sich jedoch die Veränderungen zurück, obwohl die 2-Methoxyäthanol-Applikation unverändert fortgeführt wurde. Besonders bei den Tieren mit gesplitterten oder frakturierten Zähnen beschleunigte sich das Wachstum, so daß die Zähne schnell regeneriert waren. Allerdings zeigte auch der neugewachsene Schmelz noch Trübungen und Erweichungen. Nur bei den Tieren, die in der Gewichtsentwicklung und bei den Zahnveränderungen am wenigsten von der Norm abwichen, kam es gegen Versuchsende zu einer weitgehend ungestörten Dentition, wohingegen die am stärksten betroffenen Tiere auch gegen Schluß noch - wenn auch geringgradige - Zahnveränderungen zeigten.
Bei den Tieren der Kontrollgruppen wurden in keinem Fall derartige Zahnveränderungen beobachtet.

Tab. 13: Klinische Untersuchung der Nagezähne der Gruppe 1a, Vers. IV (MOA oral 0,27g/kg KG)

Tag / Tier	1		11		18		25		32		38		43		46		50	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	II	II	II	II	II	II	IV	IV	IV	IV
	0	0	0	0	I	I	I	I	I	I	III	III	III	III	VI	IV	IV	IV
2	0	0	0	0	0	0	0	0	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II
	0	0	0	0	I	I	I	I	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III
3	0	0	0	0	0	0	0	0	I	I	II	II	II	II	II	II	II	II
	0	0	0	0	I	I	I	I	I	I	III	III	III	III	III	III	III	III
4	0	0	0	0	0	0	0	0	I	I	II	II	II	II	II	II	II	II
	0	0	0	0	I	I	I	I	I	I	III	III	III	III	III	III	III	III
5	0	0	0	0	0	0	0	0	I	I	II	II	II	II	II	II	II	II
	0	0	0	0	I	I	I	I	I	I	III	III	III	III	III	III	III	III

Tab. 14: Klinische Untersuchung der Nagezähne der Gruppe 1b, Vers. IV (MOA oral 0,54g/kg KG).

Tag / Tier	1		11		18		25		32		38		43		46		50	
1	0	0	0	0	0	0	I	I	II	II	II	II	II	II	III	III	IV	IV
	0	0	0	0	I	I	I	I	I	I	III	III	III	III	III	III	IV	IV
2	0	0	0	0	0	0	I	I	II	II	II	II	II	II	III	III	IV	IV
	0	0	0	0	I	I	I	I	I	I	III	III	III	III	III	III	IV	IV
3	0	0	0	0	0	0	I	I	II	II	II	II	II	II	III	III	IV	IV
	0	0	0	0	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	III	III	III	III
4	0	0	0	0	0	0	I	I	II	II	II	II	II	II	II	II	III	III
	0	0	0	0	I	I	I	I	I	I	III	III	III	III	III	III	IV	IV
5	0	0	0	0	0	0	I	I	II	II	II	II	II	II	II	II	III	III
	0	0	0	0	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	III	III	III	III

Tabelle 15: Klinische Untersuchung der Nagezähne der Gruppe 1c, Vers. IV (MOA oral 1,11g/kg KG)

Tag / Tier	1		11		18		25		32		38		43		46	50
1	O	O	I	I	+ (14Tg)											
	O	O	I	I												
2	O	O	I	I	+ (15Tg)											
	O	O	I	I												
3	O	O	I	I	+ (15Tg)											
	O	O	I	I												
4	O		I	I	I	I	II	II	+ (31Tg)							
	O	O	I	I	I	I	II	II								
5	O	O	I	I	I	I	II	II	II	II	II	II	VI	IV	+ (44Tg)	
	O	O	I	I	I	I	II	II	III	III	III	III	IV	IV		

Tabelle 16: Klinische Untersuchung der Nagezähne der Gruppe 1d, Vers. IV (MOA oral 2,25g/kg KG)

Tag / Tier	1		11		18		25		32		38	43	46	50
1	O	O	I	I	+ (11Tg)									
	O	O	I	I										
2	O	O	I	I	I	I	+ (22Tg)							
	O	O	I	I	I	I								
3	O	O	I	I	+ (15Tg)									
	O	O	I	I										
4	O	O	I	I	+ (11Tg)									
	O	O	I	I										
5	O	O	I	I	I	I	II	II	II	II	+ (35Tg)			
	O	O	I	I	I	I	II	II	III	III				

Tabelle 17: Klinische Untersuchung der Nagezähne der Gruppe 2a, Vers. IV (MOA oral 0,27g/kg KG + T8O 0,75g/kg KG).

Tag / Woche	1		1B		2.		32		3B		43		46		5C	
									+(36Tg)							

Tabelle 18: Klinische Untersuchung der Nagezähne der Gruppe 2b, Vers. IV (MOA oral 0,54g/kg KG + T8O 0,75g/kg KG).

Tag / Woche	1		1B		2B		32		3B		43		46		5C	
									+(32Tg)							

Tabelle 19: Klinische Untersuchung der Nagezähne der Gruppe 2c, Vers. IV (MDA oral 1,11g/kg KG + T80 0,75g/kg KG).

Tag / Tier	1		11		18	25	32	38	43	46	50
1	0	0	I	I	+(11.Tg)						
	0	0	II	II							
2	0	0	I	I	+(11.Tg)						
	0	0	II	II							
3	0	0	I	I	II	II	II	II	II	II	II	II	III	III	IV	IV	VI	VI
	0	0	II	II	II	II	II	II	III	III	IV	V	IV	VI	VI	VI	VI	VI
4	0	0	I	I	+(14.Tg)						
	0	0	II	II							
5	0	0	I	I	+(14.Tg)						
	0	0	II	II							

Tabelle 20: Klinische Untersuchung der Nagezähne der Gruppe 2d, Vers. IV (MDA oral 2,25g/kg KG + T80 0,75g/kg KG).

Tag / Tier	1		11		18	25	32	38	43	46	50
1	0	0	I	I	+(11.Tg)						
	0	0	II	II							
2	0	0	+(7.Tg)								
	0	0									
3	0	0	I	I	+(11.Tg)						
	0	0	I	I							
4	0	0	I	I	+(16.Tg)						
	0	0	I	I							
5	0	0	+(6.Tg)								
	0	0									

3.3.3 Röntgenuntersuchung der Nagezähne

Bereits in den Voruntersuchungen zeigte sich, daß durch die Röntgenuntersuchung der Nagezähne mit der hier angewandten Methode keine aussagekräftigen Erkenntnisse über Struktur und Umfang der durch 2-Methoxyäthanol verursachten Zahnveränderungen zu erhalten waren. Das Auflösungsvermögen des zur Verfügung stehenden Röntgenfilms ist bei der geringen Größe der Objekte begrenzt. Aus diesem Grund wurde auf eine systematische Untersuchung verzichtet.

Abb. 8: Röntgenaufnahme der unteren Nagezähne von Ratten. Der obere Zahn (B) stammt von einem mit MOÄ behandelten Tier, der untere von einem Tier der Kontrolle (K).

3.3.4 Histologische Untersuchung der Nagezähne

Systematisch untersucht wurden die unteren Nagezähne von jeweils 5 Ratten aus den Gruppen V 1 und V 2 :

Gruppe V 1	Gruppe V 2
Tier Nr. 3	Tier Nr. 3
" " 7	" " 4
" " 9	" " 9
" " 12	" " 15
" " 15	" " 18

Die Auswahl der Tiere geschah rein zufällig. In den Vorversuchen zur Erlernung der Technik der Herstellung von Schliffpräparaten wurden die Nagezähne von Tieren aus den Gruppen IV 1 und IV 2 bearbeitet, die noch während des Versuchs verstorben waren.
Mit Abbildung 9 soll eine Übersicht über die Lage der im folgenden beschriebenen Ausschnitte der Nagezähne gegeben werden.
Auf Abbildung 10 findet sich ein normaler Nagezahn in der Entwicklung . Man kann klar zwischen einer etwa ein Fünftel umfassenden äußeren Schmelzschicht und einer etwa vier Fünftel umfassenden inneren Schmelzschicht unterscheiden. Die innere Schmelzschicht ist deutlich gestreift, die äußere Schicht hingegen erscheint homogen. Abbildung 10 zeigt die Phase der Entwicklung, in der sich der Schmelz aus einem Hämatoxylin-Eosin anfärbbarem Stadium am rechten Bildrand in einen nicht mehr anfärbbaren Schmelz am linken Bildrand umwandelt.
In der nächsten Phase der Entwicklung (Abb. 11) wird die Streifung der inneren Schmelzschicht langsam aufgehoben. Die Homogenisierung beginnt an der Schmelz-Dentin-Grenze und verbreitert sich keilförmig bis zum Übergang zur äußeren Schmelzschicht.
Abbildung 12 zeigt die einsetzende Pigmentierung der äußersten Schmelzregion. Die Streifung der inneren Schmelzschicht ist verschwunden.
Abbildung 13 gibt den histologischen Aufbau eines normalen, vollentwickelten Nagezahns der Ratte wieder mit folgenden Strukturen: Pigmentschicht, äußere Schmelzschicht, innere Schmelzschicht (der Schmelz ist nicht mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt) sowie Dentin.

Durch die Applikation von 2-Methoxyäthanol ergeben sich nun folgende Störungen in der Entwicklung des Nagezahns:
Abbildung 14 zeigt als einfachste Form der Abweichung von einer normalen Entwicklung des Schmelzes die fehlende Homogenisierung der inneren Schmelzschicht. Dabei ist die Pigmentierung der äußeren Schmelzschicht noch nicht betroffen.
Diese Abnormität wurde auch in einem Fall bei der Kontrollgruppe beobachtet, so daß sie auch als unspezifisch betrachtet werden kann (Versuchsgruppe I, Tier Nr. 4).
Im weiteren Verlauf kommt es zu einem Verlust der Pigmentierung (Abb. 15). Die äußere Schmelzschicht erscheint weiß getrübt und die Streifung der inneren Schmelzschicht wird stärker.
Die innere Schmelzschicht ist in Abbildung 16 stark mit Hämatoxylin-Eosin anfärbbar, ebenso die äußere Schmelzschicht. Der Bereich vor der Schmelz-Dentin-Grenze zeigt die typische Streifung.

Aus den Vorversuchen sei noch der Schliff eines oberen Nagezahnes gezeigt, der ein Beispiel für die weiter durch 2-Methoxyäthanol hervorgerufenen möglichen Veränderungen gibt:
Der Schmelz ist bis zur Schmelz-Dentin-Grenze mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt (Abb. 17) sowie als stärkste histologisch beobachtete Abweichung ein Schmelzdefekt (Abb. 18).

Die festgestellten Veränderungen betreffen also hauptsächlich die Entwicklung des Schmelzes. Inwieweit die Bildung des Dentins durch 2-Methoxyäthanol beeinflußt wird, ist mit der hier angewandten Methode nicht zu bestimmen. Die Entwicklung erscheint jedoch normal zu verlaufen. Ebenso ist weder beim Schmelz noch beim Dentin eine Minderproduktion festzustellen, abgesehen von einer generellen Unterentwicklung der Ratten durch 2-Methoxyäthanol, die sich auch auf die Nagezähne auswirkt.

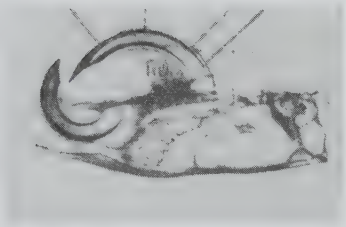


Abb.: 10 11 12 13 - 18

Abb. 9: Röntgenaufnahme eines Rattenschädels zur Demonstration der ungefähren Lage der Abbildungen 10 - 18 auf dem Nagezahn.

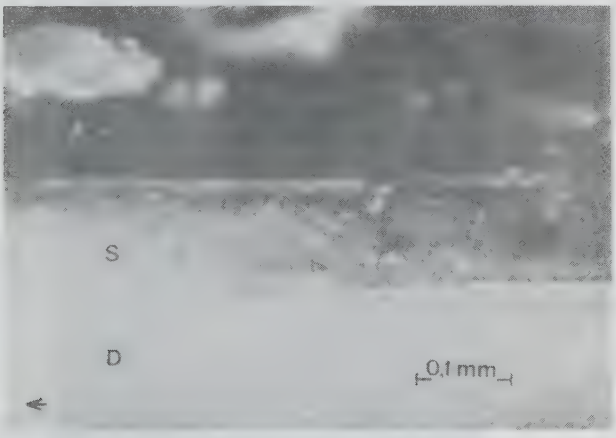


Abb. 10: Schliffpräparat eines normalen Nagezahns (Tier Nr. 9, Gruppe V 2). Der Schmelz reift von einem mit HE anfärbbarem Stadium zu einem farbresistenten Stadium.
(S ≙ Schmelz, D ≙ Dentin, ←≙ incisal)

Abb. 11: Schliffpräparat eines normalen Nagezahns (Tier Nr. 18, Gruppe V 2). Die Prismenstruktur der inneren Schmelzschicht geht verloren (S ≙ Schmelz, D ≙ Dentin, ← ≙ incisal).

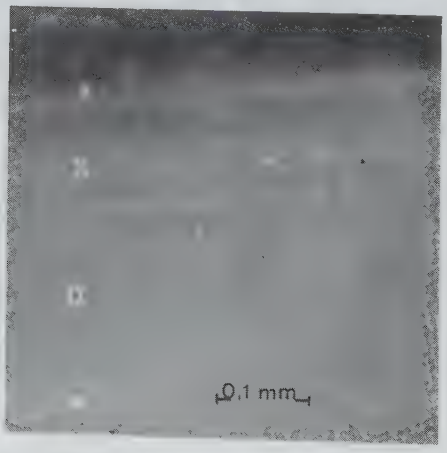


Abb. 12: Schliffpräparat eines normalen Nagezahns (Tier Nr. 4, Gruppe V 2). Beginnende Pigmentierung der äußersten Schmelzschicht (S ≙ Schmelz, D ≙ Dentin, ← ≙ incisal).

Abb. 13: Schliffpräparat eines normalen Nagezahns (Tier Nr. 4, Gruppe V 2). Schmelz und Dentin voll ausgereift (S $\hat{=}$ Schmelz, D $\hat{=}$ Dentin).

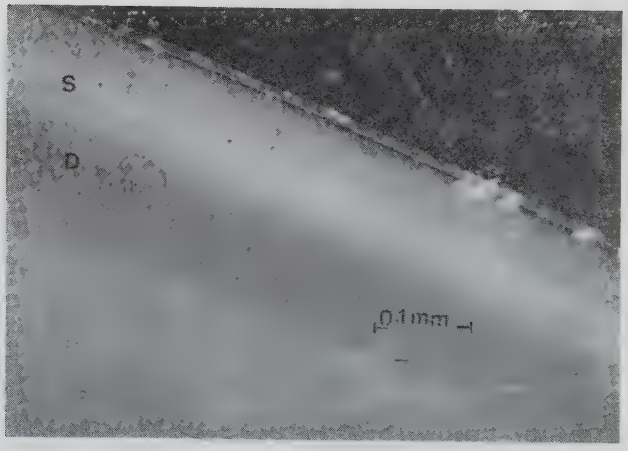


Abb. 14: Schliffpräparat des Nagezahns eines mit MOÄ behandelten Tieres (Tier Nr. 3, Gruppe V 1). Die innere Schmelzschicht zeigt deutliche Prismenstrukturen (S ≙ Schmelz, D ≙ Dentin)

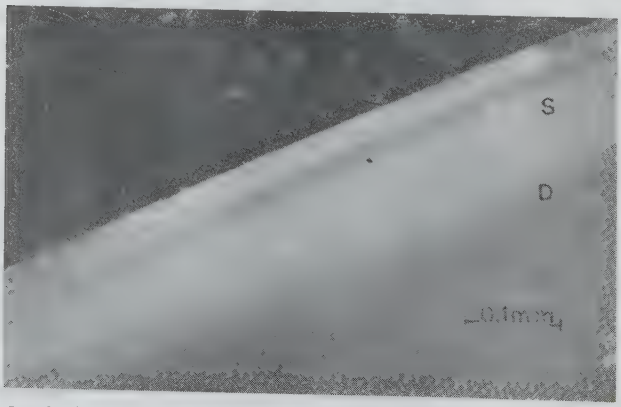


Abb. 15: Schliffpräparat des Nagezahns eines mit MOÄ behandelten Tieres (Tier Nr. 15, Gruppe V 1). Prismenstruktur der inneren Schmelzschicht, Verlust der Pigmentierung der äußeren Schmelzschicht (S ≙ Schmelz, D ≙ Dentin).

Abb. 16: Schliffpräparat des Nagezahns eines mit MOÄ behandelten Tieres (Tier Nr. 9, Gruppe V 1). Innere und äußere Schmelzschicht lassen sich mit HE anfärben (S ≙ Schmelz, D ≙ Dentin).

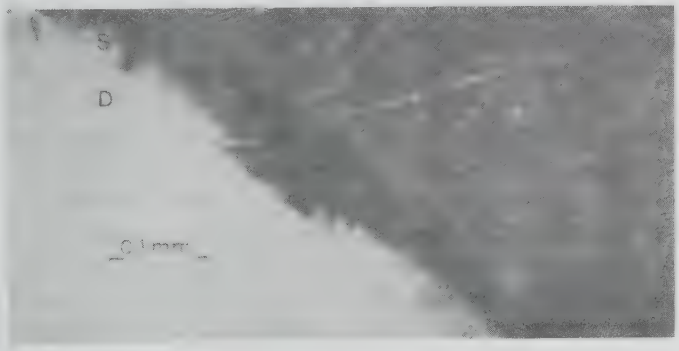


Abb. 17: Schliffpräparat des Nagezahns eines mit MOÄ behandelten Tieres (Vorversuch). Der Schmelz ist durch alle Schichten mit HE angefärbt (S ≙ Schmelz, D ≙ Dentin).

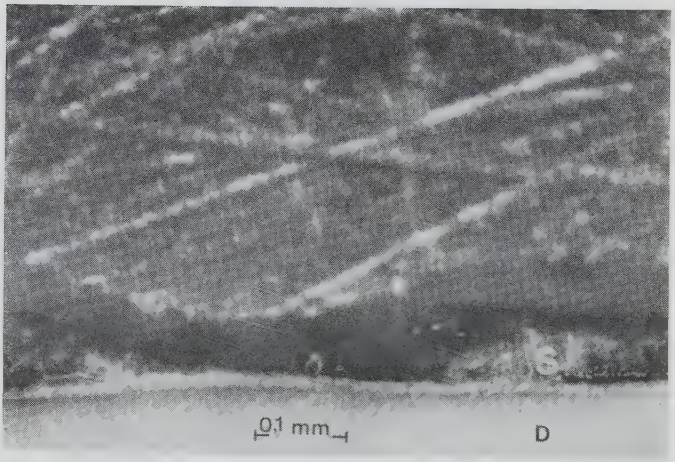


Abb. 18: Schliffpräparat des Nagezahns eines mit MOA behandelten Tieres (Vorversuch). Schmelzdefekt (S ≙ Schmelz, D ≙ Dentin).

3.3.5 Calciumgehalt von Nagezähnen, Femur und Serum

Der Ca-Gehalt der Nagezähne wurde nach Versuchsabschluß bei Tieren der Gruppen IV und V untersucht.
Die Ergebnisse von Versuch IV sind auf Tabelle 21 zusammengestellt. Wie sich erkennen läßt, sind die Unterschiede gering. Eine Zusammenstellung der Mittelwerte findet sich auf Tabelle 23. Die Tabelle zeigt, daß vor allen Dingen die Gruppe IV 2b (hohe 2-Methoxyäthanoldosis und Tween-80) erniedrigte Werte gegenüber der Kontrolle zeigt. Die Unterschiede sind zwar nicht groß, jedoch liefert die Varianzanalyse ein signifikantes Ergebnis ($P<0,01$, (p 0,01, vgl. Tab. 23). Die Berechnung orthogonaler Kontraste nach dem auf Tabelle 22 dargestellten Schema ergibt signifikante Ergebnisse lediglich für den Dosiseffekt und die Wechselwirkung (Tab. 23). Wie die Mittelwerttabelle (Tab. 23) erkennen läßt, ergibt sich daraus, daß nur bei der hohen Dosis ein erkennbarer Abfall des Zahn-Ca eingetreten war und die mit der niedrigeren Dosis behandelte Gruppe innerhalb der Streubreite der Kontrollgruppe lagen. Die signifikante Wechselwirkung bringt zum Ausdruck, daß die zusätzliche Tweenverabreichung sich nur in der hohen Dosisgruppe auswirkte, während sie in der niedrig dosierten Gruppe keine Veränderungen des Zahn-Ca hervorrief.
Nach diesen Ergebnissen wurden die gleichen Untersuchungen auch mit Zähnen aus Versuch V durchgeführt. In diesem Experiment war die 2-Methoxyäthanol-Dosis geringfügig höher als die von Gruppe IV 2b. Die Gruppe wurde mit Hilfe des F-Testes verglichen; das errechnete F lag wenig über dem geforderten Signifikanzniveau und ergab eine Irrtumswahrscheinlichkeit zwischen 5 und 10 % (vgl. Tab. 24). Größere Unterschiede ergaben sich bei der Ca-Bestimmung im Femur. Wie Tabelle 25 erkennen läßt, war hier der Wert in der Gruppe um 10 % gegenüber der Kontrolle erniedrigt. Im F-Test erwies sich dieser Unterschied als signifikant ($P < 0,01$).
Auch das Serum-Ca, daß bei den Tieren des Versuchs V bestimmt wurde, ließ ein deutliches Absinken in der behandelten Gruppe erkennen. Während die Kontrollgruppe mit 4,98 mval/l Normalwerte erkennen ließ, war die mit 2-Methoxyäthanol behandelte Gruppe um 0,4 mval/l abgefallen, das entspricht einem Abfall von knapp 10 %. Im F-Test war der Gruppenunterschied mit $P < 0,01$ signifikant (vgl. Tab. 26).

Tabelle 21: Ca^{2+}-Werte im Zahn, Versuch IV.

Gruppe	Tier Nr.	Zahn-ca^{2+} % der Zahneinwaage
1 a - MOÄ 0,27g/kg KG	1	23,14
	2	24,40
	3	24,95
	4	24,87
	5	24,81
1 b - MOÄ 0,54g/kg KG	1	23,78
	2	23,95
	3	24,35
	4	24,52
	5	24,39
2 a - MOÄ 0,27g/kg KG T 80 0,75g/kg KG	2	25,04
	3	25,02
	4	24,62
	5	25,54
2 b - MOÄ 0,54g/kg KG T 80 0,75g/kg KG	1	23,45
	2	23,53
	3	22,58
	4	24,01
2 c - MOÄ 1,11g/kg KG T 80 0,75g/kg KG	3	22,71
3 - Kontrolle	1	25,10
	2	24,69
	3	24,23
	4	24,70
	5	24,88

Tabelle 22: Berechnung von orthogonalen Kontrasten zur Zerlegung der Varianz zwischen den Stichproben in einen Behandlungs-, einen Tween-, einen Dosis- und einen Wechselwirkungseffekt.

Gruppe	Kontrast 1 (Beh.E.)	2 (Tw.E.)	3 (Dos.E.)	4 (Ww.E.)
IV 1a (MOÄ↓)	+	+	+	+
IV 1b (MOÄ↑)	+	+	-	-
IV 2a (MOÄ↓+T80)	+	-	+	-
IV 2b (MOÄ↑+T80)	+	-	-	+
IV 3 Kontrolle	-	0	0	0

Tabelle 23: Statistische Auswertung der Ca-Werte im Nagezahn der oral mit MOÄ behandelten Gruppen des IV. Versuchs. Mittelwerttabelle und Zerlegung der Varianz in orthogonale Kontraste nach Tab. 22.

Gruppe:	Mittelwert (g):	Stand.Abw.:	N:
IV 1a (MOÄ↓)	24.43	.75	5
IV 1b (MOÄ↑)	24.20	.32	5
IV 2a (MOÄ↓+T80)	25.06	.38	5
IV 2b (MOÄ↑+T80)	23.40	.60	4
IV 3 Kontrolle	24.72	.32	5

Varianzanalyse:

Var.Urs.	SAQ:	FG:	MAQ:	F:	P:
Zwischen	6.4797	4	1.61993	6.37	<0.01
Kontr. 1 (Beh.E.)	.7749	1		3.05	-
Kontr. 2 (Tw.E.)	.0378	1		.15	-
Kontr. 3 (Dos.E.)	3.4061	1		13.40	<0.01
Kontr. 4 (Ww.-E.)	1.6623	1		6.54	<0.05
Innerhalb	4.5742	18	.25412		
Gesamt	11.05391	22			

Tabelle 24: Ca^{2+}-Werte im Zahn, Versuch V.

Gruppe V 1 (MOÄ)		Gruppe V 2 (Kontr.)	
Tier Nr.	Zahn-Ca^{2+} % der Zahneinwaage	Tier Nr.	Zahn-Ca^{2+} der Zahneinwaage
1	22,38	1	26,40
2	24,64	2	25,37
8	24,82	5	25,24
10	23,96	6	24,60
11	23,74	7	24,96
13	22,22	8	23,94
14	24,62	10	25,13
18	24,69	11	23,76
19	25,60	12	23,63
20	22,54	13	24,85
$\bar{X}$	23,92	$\bar{X}$	24,78
S	1,18	S	0,85

$\hat{F}_{(1,19)} = 3,58;\ 0,1 > p > 0,05$

Tabelle 25: Ca^{2+}-Werte im Femur, Versuch V.

Gruppe V 1 (MOÄ)		Gruppe V 2 (Kontr.)	
Tier Nr.	Femur-Ca^{2+} % der Knocheneinwaage	Tier Nr.	Femur-Ca^{2+} % der Knocheneinwaage
1	22,86	1	24,44
2	21,09	2	23,90
8	22,29	5	24,23
10	21,38	6	24,03
11	22,74	7	24,57
13	22,65	8	24,03
14	20,20	10	23,90
18	21,56	11	24,59
19	23,28	12	24,51
20	19,97	13	23,89
$\bar{X}$	21,80	$\bar{X}$	24,21
S	1,15	S	0,29

$\hat{F}_{(1,\bar{1}8)} = 41,44;\quad p < 0,01$

Tabelle 26: Ca^{2+}-Werte im Serum, Versuch V.

Gruppe V 1 (MOÄ)		Gruppe V 2 (Kontr.)	
Tier Nr.	Serum-Ca^{2+} mval/l	Tier Nr.	Serum-Ca^{2+} mval/l
1	4,60	1	4,79
2	4,34	2	4,98
3	4,55	3	4,95
7	4,67	4	4,85
8	4,48	5	4,52
9	4,35	6	4,65
10	4,59	7	5,02
11	4,67	8	5,04
12	4,45	9	4,87
13	4,77	10	4,89
14	4,71	11	5,23
15	4,72	12	5,07
18	4,54	13	4,95
19	4,58	14	5,09
		15	4,93
$\bar{X}$	4,57	16	5,04
S	0,13	17	5,20
		18	5,01
		19	5,18
		20	5,39
		$\bar{X}$	4,98
		S	0,20

$\hat{F}(1,32) = 45,34;\ p < 0,01$

3.4 Diskussion

Der Sinn tierexperimenteller Untersuchungen von Umweltchemikalien ist es, die Wirkung der betreffenden Substanz auf den lebenden Organismus zu testen. Zwar können heute durch in-Vitro-Versuche bereits viele Tierversuche ersetzt werden, doch ist das Zusammenspiel aller Zellen, Gewebe und Organe im Reagenzglas nicht nachzuvollziehen. Es ist daher nicht verwunderlich, daß es bei Tierversuchen immer wieder zu nicht erwarteten Ergebnissen kommt. So ist in der vorliegenden Arbeit nicht das zunächst untersuchte Pestizid Ursache pathologischer Veränderungen, sondern das als Lösungsmittel benutzte 2-Methoxyäthanol. Dabei zeigte sich wie bereits im ersten Teil der Arbeit beschrieben, daß 2-Methoxyäthanol nur bei oraler und nicht bei lokaler Applikation zu Katarakten und Zahnveränderungen führt.
Der Wirkungsmechanismus auf dem diese Veränderungen beruhen, ist noch unbekannt. Aufgrund eines Vergleichs mit anderen kataraktogenen Substanzen waren bereits im Verlauf der Versuche verschiedene Hypothesen gebildet worden:

I. 2-Methoxyäthanol wird im Rattenkörper nach hydrolytischer Spaltung zu Glykol und durch Oxydation zu Oxalsäure metabolisiert. Durch die Bindung der Oxalsäure mit Calciumionen entsteht schwerlösliches Calciumoxalat, das in der Linse ausfällt.

II. 2-Methoxyäthanol lockert als Lösungsmittel das Gefüge biologischer Membran auf. Durch Lyse von Linsenfasermembranen würden dann Katarakte entstehen.

III. Analog den Vorgängen bei der Cataracta tetanica führt ein durch 2-Methoxyäthanol bedingter Calciummangel zu einer Trübung der Linse.

Letzter Verdacht war dadurch hervorgerufen worden, daß es erstens im Versuchsverlauf zu Zahnveränderungen bei den mit 2-Methoxyäthanol behandelten Tiere kam, zweitens bei der Sektion verstorbener Tiere sich eine erhebliche vermehrte Brüchigkeit der Knochen erkennen ließ und drittens die Tiere ein möglicherweise

tetanisches Krampfen erkennen ließen.
Während die Untersuchungen zur ersten Theorie in der Dissertation STUTZ (1980) und die Untersuchungen zur zweiten Theorie in der Dissertation KÖSTER (1980) abgehandelt werden, sollte die Theorie einer Calciummangelkatarakt durch 2-Methoxyäthanol in der vorliegenden Arbeit weiter behandelt werden. Gleichzeitig bot es sich an, die im Rahmen des Versuchs aufgetretenen Zahnveränderungen näher zu untersuchen und möglicherweise Vorstellungen über ihre Entwicklung zu gewinnen, da die gleichzeitig auftretende Katarakt hierzu enge Beziehungen aufweisen könnte.

3.4.1 Klinische Untersuchung

Da die Wirkung von 2-Methoxyäthanol auf die Nagezähne der Ratte ein Zufallsbefund war, beschränkte sich die Auswertung der ersten Versuche mit oraler Gabe mit 2-Methoxyäthanol auf eine reine Beobachtungs- und Verlaufskontrolle. Um den klinischen Befund detailliert auswerten zu können, war es notwendig, ein Befundschema zu erarbeiten, das es erlaubt, das Ergebnis in "harten Zahlen" auszudrücken. Die Untersuchung beschränkte sich auf den Schmelz, da er die vestibuläre Fläche bedeckend leicht zugänglich ist und nur hier klassifizierbare Veränderungen zu beobachten waren. Als Kreterien wurden die Farbe, die Transparenz und die Konsistenz des Schmelzes herangezogen und daraus eine Skala von fünf Veränderungsgraden erstellt.
Als relativ schwierig erwies sich während des Versuchs die Einteilung in Befundgruppen nach der Konsistenz; waren doch die Erweichungszonen teilweise sehr begrenzt. Bei größeren Erweichungen ergab sich darüber hinaus folgendes Problem: Relativ kräftige Tiere mit weniger ausgeprägter Erweichung schabten bei der Nahrungsaufnahme mehr Schmelz ab und rutschten damit in eine höhere Bewertungsklasse als geschwächte Tiere mit stärkeren Zahnveränderungen.
Die klinische Untersuchung ergab deutlich, daß 2-Methoxyäthanol in der Lage ist, die Bildung des Zahnschmelzes zu beeinflussen. Dabei ist eine Dosisabhängigkeit und eine Verstärkung der Wirkung

durch gleichzeitige Gabe von Tween-80 zu erkennen. Interessant ist, daß ein Vergleich der Zahnstörungen und der Kataraktentwicklung eine ungefähre Parallelität in der zeitlichen Abfolge und auch der jeweiligen Intensität der Veränderungen ergibt, so daß hier eine gemeinsame Ursache diskutiert werden kann (vgl. KIRCHHOFF, 1980).
Veränderungen in der Transparenz und der Konsistenz von Zähnen werden in der Zahnmedizin allgemein als Symptome von Mineralisationsstörungen gewertet. Damit ist ein erster Hinweis auf die Wirkung von 2-Methoxyäthanol gegeben.

3.4.2 Histologische Untersuchung

Dieser Hinweis auf Mineralisationsstörungen wird auch durch die histologische Untersuchung bestätigt.
Bei der Präparation erwies es sich als schwierig, die in Kunststoff eingebetteten Zähne genau in der Sagittalebene plan zu schleifen, um so Unschärfen der Fotografien zu vermeiden, was leider nicht immer gelang. Erleichternd wirkte die Einbettung in klaren Kunststoff.
Für die Aufnahmetechnik ist es bedeutsam, daß die Prismenstruktur des unreifen Schmelzes nur bei Seitenbeleuchtung klar zu erkennen ist. Wichtigstes Ergebnis ist, daß die Matrix zumindest in ihrer Stärke unverändert ist und der durch 2-Methoxyäthanol geschädigte Schmelz dem noch nicht voll entwickelten Schmelz der Kontrolle gleicht. Daher beruht die Wirkung von 2-Methoxyäthanol eher auf einer Mineralisationsstörung als auf einer Störung der Matrixbildung. Ob es sich dabei um eine spezifische Wirkung auf Kernbildung und Wachstum der Apatitkristalle (siehe Kap. 3.1.6.3) oder um eine allgemeine Wirkung handelt, ist aus der histologischen Untersuchung nicht abzuleiten; dazu sind weiterführende chemische Untersuchungen erforderlich.
Die starke Unterentwicklung der Versuchstiere spricht jedoch für eine allgemeine Wirkung wie auch die Tatsache, daß sowohl die Mineralisation der Knochen als auch des Schmelzes gestört ist, obwohl hier verschiedene Trägermoleküle als Kristalli-

sationskeime vorliegen (Keratin beim Schmelz und Kollagen im Knochen, vgl. 3.1.4, 3.1.5.1 und 3.1.6.3).

3.4.3 Calciumbestimmungen

Nachdem alles darauf hin deutet, daß eine Störung im Calciumstoffwechsel als Ursache für die Zahnveränderungen und damit möglicherweise auch für die Katarakt anzusehen ist, war es naheliegend, durch genaue Messungen des Calciumgehaltes die Versuche in diese Richtung zu präzisieren. Durch die Untersuchung der Nagezähne sollten die Ergebnisse der klinischen und histologischen Untersuchung ergänzt werden.
Es zeigt sich, daß der Ca-Anteil des Nagezahns durch 2-Methoxyäthanol gering erniedrigt wird. Dabei konnte nur für die hoch dosierte Gruppe des Experiments IV ein signifikanter Dosiseffekt nachgewiesen werden, während der in Experiment V festgestellte Unterschied im F-Test das geforderte Signifikanzniveau von 5 % gerade nicht erreichte. Das mag darauf zurückzuführen sein, daß sowohl Schmelz als auch Dentin und Zement gemeinsam als Ausgangsmaterial für die Bestimmung diente, jedoch nur im Schmelz gravierende Veränderungen zu beobachten waren. Dadurch wird das Ergebnis natürlich verwässert.
Da bekanntlich die Zähne in der "Mineralisationshierarchie" die Spitze einnehmen, ist bei einer Calciumbestimmung im Knochen, die ja bereits bei der Sektion durch ihre Brüchigkeit auffielen, mit aussagestärkeren Ergebnissen zu rechnen. Hier ließ sich statistisch gesichert nachweisen, daß der Calciumgehalt erniedrigt ist.
Die Calciumbestimmung im Serum der mit 2-Methoxyäthanol behandelten Versuchstiere als letzter Untersuchungsschritt dieser Arbeit bestätigt ebenfalls den gravierenden durch 2-Methoxyäthanol hervorgerufenen Eingriff in den Calciumstoffwechsel.

3.4.4 Wirkung von Tween-80

In allen Versuchen konnte nachgewiesen werden, daß die Wirkung von 2-Methoxyäthanol durch die gleichzeitige Applikation von Tween-80 verstärkt wird. Aus Versuch III geht jedoch eindeutig hervor, daß Tween-80 selbst keine pathologischen Veränderungen hervorruft, was letztlich nicht verwundert, da es in der Lebensmittelproduktion keine unerhebliche Rolle spielt und hier per Gesetz eingehende Voruntersuchungen gefordert sind. Einen Hinweis auf die fördernde Wirkung von Tween-80 läßt sich der Literatur entnehmen: So schreiben verschiedene Autoren Tween-80 eine absorptionsdynamische Wirkung zu (JONES, 1948; KANEDA et al, 1975; HIKAL, 1976):
Tween-80 bildet als Emulgator ähnlich den Gallensäuren eine Zwischenschicht zwischen Darmepithel und Darminhalt, die dessen Resorption erleichtert. Es ist daher auch im vorliegenden Fall denkbar, daß die Resorption von 2-Methoxyäthanol durch Tween-80 gefördert wird und dadurch schon bei geringeren Dosierungen toxische Konzentrationen erreicht werden.

3.4.5 Schlußbetrachtung

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß 2-Methoxyäthanol bei oraler Applikation in der Lage ist, den Calciumgehalt der Nagezähne und der Knochen sowie des Serums zu erniedrigen. Damit kann die Möglichkeit diskutiert werden, ob es sich bei der 2-Methoxyäthanol-Katarakt um einen hypocalcämische Katarakt ähnlich der cataracta tetanica nach Parathyreoidektomie handelt. Dieses Ergebnis ist umso bedeutsamer, da sowohl die von KÖSTER (1980) durchgeführten Untersuchungen zur Lipidfreisetzung durch 2-Methoxyäthanol als auch die von STUTZ (1980) beschriebenen Versuche zur Oxalsäure-Theorie kein aussagekräftiges Resultat ergaben, so daß weitere Versuche in dieser Richtung als unfruchtbar angesehen werden können und damit die Deutung der 2-Methoxyäthanol-Katarakt als Calciummangelkatarakt für weitere Versuche richtungsweisend erscheint.

Ein Zusammentreffen von Linsenveränderungen mit Zahnveränderungen ist auch bei der cataracta tetanica beschrieben (PREISWERK-MAGGI, 1915; ERDHEIM, 1914; HIROIHI, 1924).

Einige Unterschiede sind jedoch zwischen der in der Literatur beschriebenen Zahnanomalien hervorgerufen durch eine parathyreoprive Tetanie und den Veränderungen durch 2-Methoxyäthanol zu registrieren:

So konnte ich keine ausgeprägten Dentinanomalien in Form von unverkalkten Dentinzonen beobachten, wie sie bei der parathyreopriven Tetanie beschrieben sind. Dennoch kann vermutet werden, daß auch 2-Methoxyäthanol die Mineralisation des Dentins beeinflußt, da die Zähne teilweise frakturierten, also ihre Festigkeit, die maßgeblich vom Zahnbein diktiert wird, beeinträchtigt war.

Des weiteren werden Schmelzhypoplasien bei parathyreopriver Tetanie als Ausdruck nicht nur einer mangelnden Verkalkung, sondern einer ungenügenden Anlage der Grundsubstanz selbst, in der Literatur angegeben (PREISWERK-MAGGI, 1915). Das trifft für 2-Methoxyäthanol nicht zu; während der klinischen Untersuchung konnte in keinem Fall beobachtet werden, daß der Schmelz hypoplastisch in die Mundhöhle durchbricht; vielmehr lösten sich genügend erweichte Schmelzbezirke erst durch Abrasion vom Nagezahn ab. Auch die histologische Untersuchung zeigt Schmelzdefekte nur im Bereich der klinischen Krone. Als weiterer Unterschied ist die Tatsache anzusehen, daß die Zähne der 2-Methoxyäthanol-Ratten nie in der Alveole selbst frakturierten wie dies für durch Parathyroektonie heschädigte Nagezähne typisch ist (ISELIN,1908). Ebenfalls bestehen Unterschiede zwischen dem durch Literaturstudien gewonnenen Bild der cataracta tetanica und der 2-Methoxyäthanol-Katarakt (vgl. KIRCHHOFF, 1980).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es die bis jetzt vorliegenden Ergebnisse wahrscheinlich machen, daß die durch orale Applikation von 2-Methoxyäthanol hervorgerufene Katarakt als eine Calciummangelkatarakt anzusehen ist. Die Unterscheidung, ob es sich dabei um eine Variante der cataracta tetanica handelt oder um eine selbständige Kataraktform,läßt sich mit den vorliegenden Ergebnissen nicht eindeutig treffen und muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Dabei erscheint es mir sinnvoll,

in einem Parallelversuch bei Ratten hypocalcämische und 2-Methoxyäthanol-bedingte Katarakte hinsichtlich ihrer Morphologie und verschiedener biochemischer Parameter wie z.B. Calcium uno Phosphatstoffwechsel zu vergleichen.

4 Zusammenfassung

Die Arbeit gliedert sich in zwei Teile:
Die Wirkung von 2,3,5,6-Tetrachloranilin auf die Augenlinsen von Ratten bei lokaler und systemischer Applikation wurde untersucht. Es zeigten sich weder Katarakte noch signifikante Veränderungen beim Linsenfrischgewicht. Die histologische Untersuchung der Milzen ergab eine vermehrte Blutfülle, die als gesteigerter Erythrozytenabbau gedeutet wird. Es konnte keine Beeinflussung der Gewichtsentwicklung nachgewiesen werden.

Das als Lösungsmittel für 2,3,5,6-Tetrachloranilin benutzte 2-Methoxyäthanol führt bei oraler Applikation zu Katarakten, Mineralisationsstörungen der Nagezähne und Knochen und einer allgemeinen Unterentwicklung der Versuchstiere. Beschrieben werden eine klinische und eine histologische Untersuchung der Nagezähne sowie Calciumbestimmungen der Nagezähne, des Femur und des Serum. Es zeigte sich, daß durch 2-Methoxyäthanol der Calciumgehalt der Nagezähne, des Femur und des Serum signifikant erniedrigt wird. Die Wirkung von 2-Methoxyäthanol wird durch gleichzeitige orale Gabe von Tween-80 noch verstärkt, das selbst jedoch nicht toxisch ist. Bedingt durch diese Befunde und die Parallelentwicklung von Katarakt und Mineralisationsstörungen wird die 2-Methoxyäthanol-Katarakt als hypocalcämische Katarakt vergleichbar der cataracta tetanica interpretiert.

5 Literaturverzeichnis

ADDISON, W.H.F. & J.L. APPLETON: The structure and growth of the incisor teeth of the albino rat. - J. Morphol. 26, 43 - 96 (1915).

ANATOLOVSKA, Z., V. HERMANSKY & H. SKALSKA: Mikrotvrdost dentinu a skloviny krysich rezaku stetracyklinovym komplexem. - Cesk. Stomatol., 73, 209 - 213 (1975).

BACHRA, B.N. & G.A. van der MEULEN-van HARSKAMP: The effect of tetracycline and oxytetracycline on the formation of biological apatit. - Calc. Tiss. Res. 11, 95 - 96 (1973).

BAKER, U.L.: The fluorescent, microradiographie, microhardness and specific gravity properties of tetracycline - affected human enamel and dentin. - Arch. oral Biol. 17, 525 - 536 (1972).

BEILSTEIN: Handbuch der organischen Chemie (2. Ergänzungswerk des 12. Bandes des Hauptwerkes). - Springer: Berlin (1950).

BERLINER, M.L.: Cataract following the inhalation of Paradichlorbenzene vapor. - Arch. Ophthal. (Chicago) 22, 1023 - 1034 (1939).

BERNSTEIN, H.H., J. CURTIS, F.L. EARL & T. KUWABARA: Phototoxic corneal and lens opacities. - Arch. Ophthal. (Chicago) 83, 336 - 348 (1970).

von BEUST, T.B.: Intrafollicular Enamel Development. - J. Amer. dent. Ass. 15, 2021 - 2031 (1928).

BHUYAN, K.C., D.K. BHUYAN & H.M. KATZIN: Amizol induced cataract and inhibition of lens catalase in rabbits. - Ophthal. Res. 5, 236 - 247 (1973).

BIRD, E.D. & W.C. THOMAS, jr.: Effects of various metals on mineralization in vitro. - Proc. Soz. exp. Biol. Med. 112, 640 - 643 (1963).

BÖHNE, H. & K. HARTKE: Polyäthylenglycolsorbitoleat. - Aus: DAB 7, S. 1245 - 1249, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart (1968).

BÖTTEL, M.: Untersuchungen über die Wirkung von Pentachlorphenol, 2,4,5-Trichlorphenol und Chlorferron auf die Linsentransparenz von Ratten. - Diss. Bonn (im Druck).

BORDELAU, L.M. & R. BARTHA : Biochemical transformation of herbicide-derived anilins in culture medium and in soil. - Canad. J. Microbiol. 18, 1857 - 1864 (1972).

BORDELAU, L.M. & R. BARTHAR: Biochemical transformation of herbicide-derived anilins chact. of causing enzymes. - Canad. J. Microbiol. 18, 1865 - 1871 (1972).

BRADFORD, E.W.: Zit. A.E.W. Miles: Structural and chemical organization of teeth. - Vol. II, Academic Press: New York & London (1967).

BUDDECKE, E.: Grundriß der Biochemie. - de Gruyter: Berlin (1974).

BUGESS, R.C., G. NIKIFORUK & C. MACLAREN: Chromatographic studies of carbohydrate components in enamel. - Arch. oral Biol. 3, 8 - 14 (1960).

CARPENTER, C.P. & H.F. SMYTH: Chemical burns of the rabbit cornea. - Amer. J. Ophthal. 29, 1363 - 1372 (1946).

CARPENTER, C.P., U.C. POZZANI, C.S. WEIL, J.H. NAIR & H.F. SMYTH: The toxocity of Butyl cellosolve solvent. - J. Amer. Med. Ass. 14, 114 - 131 (1956).

CARTIER, P.: Die Mineralbestandteile der calcificierten Gewebe. 1. Mitt. Die Mineralstruktur des Knochens, des Dentins und des Zementes. - Bull. Soc. Chim. biol. 30, 65 - 73 (1948 a).

CARTIER, P.: Die Mineralbestandteile der calcificierten Gewebe. 2.Mitt. Die molekulare Struktur des Knochenmineralstoffes. - Bull. Soc. Chim. biol. 30, 73 - 81 (1948 b).

CARTIER, P.: Die Mineralbestandteile der calcificierten Gewebe. 3. Mitt. Die an den Proteinen der Knochen gebundene Phosphocalcium-Fraktion. - Bull. Soc. Chim. biol. 31, 432 - 440 (1949).

CARTIER, P. & A. LANZETTA: Die Mineralbestandteile von calcificierten Geweben. 8. Mitt. Die Bindung zwischen dem Kollagen und dem "Knochensalz". - Bull. Soc. Chim. biol. 43, 981 - 992 (1961).

CLARK, R.D., J.G. SMITH, jr. & E.A. DAVIDSON: Hexosamine and acid glycosaminoglycans in human teeth. - Biochim. Biophys. Acta 101, 267 - 272 (1965).

CHOW, Y.K. & S.D. MURPHY: Propanil (3-4 Dichlorpropionanicide) Induced Methemoglobin Formation in Relation to its entabolism in Vitro. - Toxikol. Appl. Pharmacol. 33, 14 - 20 (1975).

CONNE, Ph., W.F. KÖRNER & L.-J. BAUME: Les effets d'une hypovitaminose et d'une avitaminose A de plus en plus prolongees sur l'incisive du rat blanc. - Schweiz. Mschr. Zahnheilk. 78, 1061 - 1081 (1968).

CONNE, Ph. & L.-J. BAUME: Calcification de l'email et de la dentine de l'incisive du rat blanc carence en vitamine A. Etude comparative distologique et microradiographique. - J. Canad. dent. Ass. 35, 589 - 598 (1969).

CONNE, Ph. & L.-J. BAUME: The Calcification Pattern in the Enamel of the Rat Incisor. - Helv. odontol. Acta, 14, 17 - 21 (1970).

CREMER: Zit. nach Hagemann (1960).

CREMER & FÜHR: Zit. nach Hagemann (1960).

CROSS, B. & W.H. GASTROCK: Phenylnitramin herbicide. - U.S.3, 844, 762; 29.10.1974.

DEAN, H.T.: Endemic fluorosis and its relation to dental caries. - Pub. Health Reports 53, 1443 - 1552 (1938).

DISTEFAVO, V., W.F. NEUMANN & G. ROUSER: The isolation of a phosphate ester from calcifiable cartilage. - Arch. Biochim. Biophys. 47, 218 - 220 (1953).

DONLEY, D.E.: Toxic encephalopathie and volatile solvents in industry. - J. Ind. Hyg. Toxicol. 18, 571 - 577 (1936).

DRAIZE, J.H., W. WOODARD & H.D. CALVERY: Methods for the studies of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and other mucous membrans. - J. Pharm. Exp. Therap. 82, 377 - 390 (1944).

DREIKORN, B.A.: Procluticide composition. - Patentschrift. Ger. (offen) 2, 642, 147; 7.4.1977.

EASTOE, J.E.: The amine acid composition of proteins from the oral tissues. II. The matrix proteins in dentine and enamel from developing human deciduous teeth. - Archs oral Biol. 8, 633 - 652 (1963).

EATON, R.H. & D.W. MOSS: Inhibition of the orthophosphatase and pyrophosphatase activities of human alkaline-phosphatase preparations. - Biochem. J. 102, 917 - 921 (1967).

EISENMANN, D.R. & J.A. YAEGER: Alterations in the formation of rat dentine and enamel induced by various ions. - Archs oral Biol. 14, 1045 - 1064 (1969).

ERDHEIM, J.: Rachitis und Epithelkörperchen. - Math. Naturwis. Klasse, Wien, 90, 363 - 688 (1914).

FAIRBANKS & MITCHELL: Availability of calcium in spinach, in skim milk powder and in calcium oxalate. - J. Nutr. 16, 79 - 89 (1938).

FEARNHEAD, R.W.: Mineralization of rat enamel. - Nature (London) 188, 509 - 510 (1960).

FLEISCH, H. & W.F. NEUMAN: Neue Gesichtspunkte der Kalkablagerung. - Schweiz. med. Wschr. 91, 858 - 861 (1961).

FRANK, R.M. & J. NALBANDIAN: Comparative aspects of development of dental hard structure. - J. dent. Res. Supplement to No. 1, 42, 422 - 437 (1963).

FRANK, R.M. & R.F. SOGNNAES: Electron microscopy of matrix formation and calcification in rat enamel. - Arch. oral Biol., 1, 339 - 348 (1960).

FREUDENBERG & GYÖRGY: Über Kalkbindung durch tierische Gewebe. - IX. Biochem. Z. 142, 407 - 416 (1923 a).

FREUDENBERG & GYÖRGY: Der Verkalkungsvorgang bei der Entwicklung des Knochens. - Ergebn. inn. Med. Kinderheilk. 24, 17 - 28 (1923 b).

GERSH, I.: Ground substance and calcification. - In: Rohahl,K., Nicholson, J.T. & E.M. Brown, jr.: Bone as a tissue. - Mc Graw-Hill: New York, Toronto & London (1960).

GLIMCHER, M.J.: Molecular biology of mineralized tissues with particular references to bone. - Rev. Mod. Physics 31, 359 - 393 (1959).

GRADY, J.E. & J.A. YAEGER: Polarizing microscopy of abnormal dentine produced by infections of strontium or fluoride. - Archs oral Biol. 10, 175 - 178 (1965).

GREENBERG, L., M.R. MAYERS, E.J. GOLDWATER, W.J. BURKE & S. MOSKOWITZ: Health hazards in the manufacture of fused collars: Exposure to Ethylenglycolmonomethylether. - J. Ind. Hyg. Toxicol. 20, 134 - 147 (1938).

GROSS, E.: Zit. bei Lehmann & Flury (1938).

HADJIMARKOS, D.M.: Selenium. - Lancet, I, 721 (1970).

HAGEMANN, E.: Ratte und Maus, Versuchstiere in der Forschung. - de Gruyter: Berlin (1960).

HAGIWARA, A. & S. SUGIWIA: The use of castor-oil and tween 80 as an ophthalmic base. - Acta Soc. Ophthal. Jap. 57, 1 - 5 (1953).

HAIMOVICI, A., M. HREMINC, R. VATAMAN, J. CONSTANTIN, A. NASTASE, G. MARTIN & R. COSTAN: Mosifari Dento-Parodontale Sub Influenta Plumbului. - Rev. Med. Chir. Soc. Me. Nat. Iasi, 74, 371 - 376 (1970).

HALL, D.A.: The caracterization of an new lipolytic enzyme in pancreatic extracts. - Biochem. J. 78, 491 - 499 (1961).

HALSE, A.: Electron microprobe analysis of deep layers of rat incisor enamel. - Scand. J. Dent. Res. 79, 377 - 380 (1971).

HALSE, A.: An electron microprobe investigation of the distribution of iron in rat incisor enamel. - Scand. J. Dent. Res. 80, 26 - 39 (1972).

HALSE, A. & K.A. SELVIG: Mineral content of developing rat incisor enamel. - Scand. J. Dent. Res. 82, 40 - 46 (1974).

HALSE, A. & K.A. SELVIG: Incorporation of iron in rat incisor enamel. - Scand. J. Dent. Res. 82, 47 - 56 (1974).

HALSTEAD, L.B.: Are mitochondria directly involved in biological mineralisation? The mitochondria and the origin of bone. - Calc. Tiss. Res. 3, 103 - 104 (1969).

HARRIS, H.A.: Glycogen in cartilage. - Nature (London) 130, 996 - 997 (1932).

HARTLESS, R.L.: The influence of a high sucrose diet on the calcium and phosphorous percentage of the rat femur and comparison. - Biochem. J. 49, 574 - 577 (1951).

HIKAL, A.H., L. DYER & S.-W. WONG: Effects of Polysorbate 80 on apparent partition coefficient of salicyclic acid and its absorption from the rat intestine. - J. Pharmacol. Sci. 65, 621 - 623 (1976).

HÖHLING, H.J.: Die Bauelemente von Zahnschmelz und Dentin aus morphologischer, chemischer und struktureller Sicht. - Hauser: München (1966).

HIROISCHI, H.: Über die parathyreoprive Kataraktbildung bei Ratten. - Albrecht v. Graefes. Arch. klin. exp. Ophthal. 113, 381 - 391 (1924).

HOLLEMANN, R.: Sythese of 2,3,5,6-Tetrachloraniline. - J. Chem. Soc. (London), S. 3044 (1926).

HOLT, L.E.: Studies on calcification. III. A quantitative study of the equilibria concerned with the calcification of bone. - J. biol. Chem. 64, 579 - 587 (1925).

HOSKINS, M.M.: The effect of acetyl thyrotin on the teeth of new-born rats. - Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 25, 55 (1927-1928).

HOTZ, P.: Fluoride level in surface enamel after application of fluoride gels. - Helv. Odont. Acta 16, 32 - 34 (1972).

HYGIENIC GUIDE SERIES: Ethylenglycolmonomethylether. - Amer. Ind. Hyg. Ass. J. 31, 517 - 520 (1970).

IRVING, J.T. & J.P. WEINMANN: Experimental studies in calcification. IV. Response of dentin of the rat incisor to injections of strontium . - J. dent. Res. 27, 669 - 680 (1948).

ISMAIL, R., D. HOCKWIN, F. KORTE & W. KLEIN: Environmental chemical permeation of bovine ocular lens capsule. - Chemospere 2, 145 - 150 (1976).

ISELIN (1908): Zit. nach Preiswerk-Maggi (1915).

JOHNSON, A.R. & L. SINGER: An electron microprobe study of rats incisor teeth with low or high concentrations of strontium. - Archs oral Biol. 12, 389 - 399 (1967).

JOHNSON, A.R.: Strontium, calcium, magnesium and phosphorous content of rat incisors as determined by electron microprobe analysis. - J. Dent. Res. 51, 115 - 121 (1972).

JONES, M., P. CULVER, G. DRUMMEY, B.S. RYAN & A.E. RYAN: Modification of fat absorption in the digestive tract by the use of an emulsifying agent. - Ann. Intern. Med. 29, No. 1, 1 - 10 (1948).

KANEDA, A., K. NISHIMURA, H. SEZAKI & S. MURANISHI: Mechanism of drug absorption from micellar solution. Effect of Polysorbate 80 on the absorption of micellefree drugs. - Chem. Pharm. Bull. 23, 523 - 528 (1975).

KAUFMANN, D.D. & KEARNEY: Enzymes from soil bactering hydrolysis phenylcarbonate herbicides. - Science 147, 740 - 741 (1965).

KIRCHHOFF, P.: Die Wirkung von 3-Monochloranilin und 2-Methoxyäthanol auf die Augenlinse der Ratte. - Diss. Bonn (im Druck).

KLAUS & KOLB: Zit. in: Jung, S.: Grundlagen für die Zucht und Haltung der wichtigsten Versuchstiere. - Fischer: Stuttgart (1962).

KLEIBER, BOELTER & GREENBERG: Fasting catabolism and food utilization of calcium-deficient rats. - J. Nutr. 19, 517 - 530 (1940).

KLOTZ, O.: Studies upon calcerous degeneration. I. The process of pathological calcification. - J. exper. Med. 7, 633 - 673 (1905).

KÖSTER, P.: Die Wirkung von 2,3,5-Trichloranilin auf die Augenlinse der Ratte. - Diss. Bonn (im Druck).

KRANTZ: Zit. bei Jones (1948).

KUWABARA, T. & D.G. COGAN: Experimental aberrant lipogenesis. - Arch. Path. 63, 496 - 501 (1957).

LAMBERT, B.W.: The effect of progestins and estrogenes on the permeability of the lens. - Arch. Ophthal. (Chicago) 80, 230 - 234 (1968).

LEAVER, A.C.: Inter-relationship of calcium, phosphorus and vitamin D in the bones and teeth of the rat. - Clinical Orthopaedics and Related Research, 78, 90 - 107 (1971).

LEHMANN, K.B. & F. FLURY: Toxicology and hygiene of industrial solvents. In: Patty, F.: Industrial hygiene and toxicology, 2. Aufl., Bd. II, S. 1544, Interscience Publishers, New York (1963).

LENZ, H.: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Dentinentwicklung. - Dtsch. Zahn- Mund- Kieferheilk., Bd. 30 ff, 9 - 10 (1959)

LISTGARTEN, M.A. & I.M. SHAPIRO: Fine structure and composition of coronal cementum in guinea-pig molars. - Oral. Biol., 19, 679 - 696, Pergamon London; New York (1974).

MC CLURE, F.J. & W.L. HEWITT: The relation of penicillin to induced rat dental caries and oral l. acidophilus. - J. dent. Res. 35, 441 (1946).

MC CONNEL, D., W. FRAJOLA & D.W. DEAMER: Relation between the inorganic chemistry and biochemistry of bone mineralization. - Science 133, 281 - 282 (1961).

MCCOY, R.H.: In: E.J. Farris & J.Q. Griffith: The rat in laboratory investigations. - 2. Aufl., S. 104 - 165, Lippincolt: Philadelphia (1949).

MEFFERT, O. & H. KÄMMERER: The influence of fluoride on the mineralization of rat teeth. - Calc. Tiss. Res. 11, 176 - 178 (1973).

MELLANBY, H.: The development of teeth in the albino rat. - Brit. Dent. J. 66, 76 - 78 (1973).

MILLER, B.J.: Inhibition of experimental dental caries in the rat by fluoride and iodoacetic acid. - Proc. Soc. Exper.

MITCHELL, R. & M.D. ZAVON: Methylcellosolve intoxication. - Amer. Ind. Hyg. Ass. J. 24, 36 - 41 (1963).

NAUJOKS, R.: Ursachen der Zahnkaries in "Praxis der Zahnheilkunde", Bd. I, Urban & Schwarzenberg: München (1968).

NITTER-HAUGE, S.: Poisoning with Ethylenglycolmonomethylether. - Acta Med. Scand. 188, 277 - 280 (1970).

NORMAN, R.D. & Th.E. WALKER: The role of carboxyl groups in collagen calcification. - Biochem. Biophys. Res. Comm. 48, 1656 - 1662 (1972).

NYLEN, M.U., E.A. EANES & K.A. OMNELL: Crystal growth in rat enamel. - J. Cell Biol. 18, 109 - 123 (1963).

NYLEN, M.U. & D.B. SCOTT: An electron microscopic study on the early stages of dentinogenesis. - U.S.Public Health Service Publication No. 613, S. 1 - 55 (1958).

ORBAN, B.: Oral histology and embryology. - 2. Aufl. Kimpton: London (1949).

OSER, B.L. & M. OSER: Nutritional studies onrats on diets containing high levels of partial ester emulsifiers. - J. Nutr. 61, 235 - 252 (1957).

OSMANSKI, C.P. & J.A. YAEGER: Microradiography of rat incisor dentin during the development of the response to injected fluoride. - Anat. Res. 148, 467 - 483 (1964).

PAK, C.Y. & F.C. BARTTER: Ionic interaction with bone mineral. II. The control of Ca^{2+} and PO_4^{3-}-exchange by univalent cation-Ca^{2+} substitution at the hydroxyapatite crystal surface. - Biochim. biophys. Acta 141, 410 - 420 (1967).

PARSONS, C.E. & M.E.M. PARSONS: Toxic encephalopathie and granulopenic anemia due to volatile solvents in industry: report of two cases. - J. Ind. Hyg. Toxicol. 20, 124 - 133 (1938).

PAULI, W. & M. SAMEC: Über Löslichkeitsbeeinflussung von Elektrolyten durch Eiweißkörper. - I. Biochem. Z. 17, 235 - 256 (1909).

PAUTARD, F.G.E.: Mineralization of keratin and its comparison with the enamel matrix. - Nature (London) 199, 531 - 533 (1963).

PIETSCH, R.L., C.B. BOBO, M.D. FINKLEA & W.W. VALLOTON: Lens opacities and organophosphatecholinesterase inhibiting agents. - Amer. J. Ophthal. 73, 236 - 242 (1972).

PFAUNDLER, M.: Über Kalkadsorption und Rachitistheorien. - Wiener med. Wschr. 54, 1405 - 1409 (1904 a).

PFAUNDLER, M.: Über Kalkadsorption und Rachitistheorien. - Wiener med. Wschr. 54, 1458 - 1462 (1904 b).

PFAUNDLER, M.: Über Kalsadsorption und Rachitistheorien. - Wiener med. Wschr. 54, 1507 - 1510 (1904 c).

PFAUNDLER, M.: Über die Elemente der Gewebsverkalkung und ihre Beziehung zur Rachitisfrage. - Jb. Kinderheilk. 60, 123 - 177 (1904 d).

PREISWERK-MAGGI, P.: Über den Einfluß der Parathyreoidektomie auf die Nagezähne der Ratten. - M.f.Z. 11, 641 - 680 (1915).

QUIROGA, R. & G.K. KLINTWORTH: The pathogenesis of corneal edema induced by Tween-80. - Amer. J. Path 51, 977 - 999 (1967).

RAPPAPORT, S.C., R.F. STREBEL, E. GARNER & D. CRASTON: Lead insult to the dentition in the leopard. - Pharmacol. Therap. Dent. 2, 201 - 207 (1975).

ROBINSON, R.: The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. - Biochem. J. 17, 286 - 293 (1923).

ROBINSON, R. & K.M. SOAMES: The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. II. The phosphoric

esterase of ossifying cartilage. - Biochem. J. 18, 740 - 754 (1924).

RÖHMANN, F.: Über künstliche Ernährung und Vitamine. - In: Kanitz, A.: Biochemie der Einzeldarstellungen. II. Bornträger: Berlin (1916).

RÖMPP, H.: Chemielexikon, Bd. 4, 7. Auflage, Franckh: Stuttgart (1974).

RÖMPP, H.: Chemielexikon, Bd. 6, 7. Auflage, Franckh: Stuttgart (1977).

RÖNNHOLM, E.: The amelogenesis of human teeth as revealed by electron microscopy. II. The development of the enamel crystallites. - J. Ultrastruct. Res. 6, 249 (1962).

ROWE, V.K.: Derivates of glycol. - In: Patty, F.A.: Industrial hygiene and toxicology. - Interscience Publishers, Wiley: London-New York, 1543 - 1547 (1963).

ROWNTREE, L.G., J.H. CLARK & A.M. HAUSON: Biologic effects of thymus extract; accruing acceteration in growth and development in successive generations of rats under continuous treatment with thymus extract. - J. Amer. Med. Ass. 103, 1425 - 1430 (1934).

SAUERWEIN, E.: Kariologie. - Thieme: Stuttgart (1974).

SCHLEGEL, D., M.A. ZECH, M. KNECHT, H. IMMICH, I. ALTHOFF & U. MOHR: Vergleichende Untersuchungen bei Stoffwechselstörungen am Zahn und Knochen der Ratte. - Dtsch. zahnärztl. Z. 23, 728 - 732 (1968).

SCHMIDT, H.: Verkalkungsstadien am entmineralisierten Zahn- und Knochengewebe. - Nova Acta Leopoldina N.F. Nr. 178, 32 (1967).

SCHOUR, I. & H.B. van DYKE: Changes in the teeth following hypophysectomy. I. Changes in the incisor of the white rat. - Amer. J. Anat. 50, 397 - 433 (1932).

SCHOUR, I. & A.W. HAM: Action of vitamin D and of the parathyroid hormone on the calcium metabolism. - Arch. Pathol. 17, 22 - 39 (1934).

SCHOUR, I., W.R. TWEEDY & F.A. MC JUNKIN: The effect of single and multiple doses of the parathyroid hormone on the calcification of the dentin of the rat incisor. - Amer. J. Pathol. 10, 321 - 345 (1934).

SCHOUR, I. & J.M. ROGOFF: Changes in the rat incisor following bilateral adrenalectomy. - Amer. J. Physiol. 115, 334 - 344 (1934).

SCHOUR, I. & M.O. SMITH: Injections of sodium fluoride on enamel and dentine of the incisor of the rat. - Proc. Soc. Biol. Med. 32, 1 - 2 (1934).

SCHOUR, I. & M.O. SMITH: Mittles teeth. An experimental and histologic analysis. - J. Amer. Dent. Ass. 22, 796 - 813 (1935).

SCHOUR, I. & M. MASSLER: The teeth. - In: E.J. Farris & J.Q. Griffith: The rat in laboratory investigation. - 2. Aufl., S. 104 - 165, Lippincolt: Philadelphia (1949).

SCHÜTTE, E.: Stoffwechsel des Knochengewebes. - In: 7. Coll. Ges. Physiol. Chem., Chemie und Stoffwechsel von Binde- und Knochengewebe. Moosbach. Springer: Berlin (1956).

SCHUMACHER, G.H. &. H. SCHMIDT: Anatomie und Biochemie der Zähne. - Fischer: Stuttgart (1972).

SCOTT, A.I. & E. ECCLESON: Investigation of the general toxic and haematological effects of Parachloraniline in several species. - Excerpta Medica 118, 195 - 204 (1967).

SELVIG, K.A. & A. HALSE: Mineral content and crystal size in mature rat incisor enamel. A correlated electron microprobe and electron microscope study. - J. Ultrastruct. Res. 40, 527 - 531 (1972).

SMITH, M.C.: Effects of fluorine upon rate of eruption of rat incisor and its correlation with bone development and body growth. - J. Dent. Res. 14, 139 - 144 (1934).

SMITH, M.C. & E.M. LANTZ: Effects of feeding of fluorides upon chemical compositions of teeth and bones of albino rats. - J. Biol. Chem. 101, 677 - 683, Aug. 1933.

SLEEL, A.E.: Local factors in the mechanism of calcification. - Ann.N.Y. Acad. Sci. 60, 713 - 732 (1955).

SOKOLA, G., L. ILEWICZ, D. OLEJARCZYK & H. GOLOS: Badania stomatologicene pracowrukow wydzialu patentowui fabryki liu i drutu w zabrzu. - Czas. Stomatoli 29, 997 - 1002, Nov. 1976.

SPENCE, J.M.: Method of stucking the skull development of the living rat by several cephalometric roentgenograms. - Angle Orthodont. 10, 127 - 139 (1940).

STARREK, E.: Über die Wirkung einiger Alkohole, Glykole und Ester. - Zit. in: Lehmann, H.B. & F. Flury (1938).

STEWART, K.A. & A.C. MAGES: Effects of zinc toxicity on calcium, phosphorous and magnesium metabolism of young rats. - J. Nutr. 82, 287 - 295 (1964).

STUTZ, P.: Die Wirkung von 3,4-Dichloranilin auf die Augenlinse der Ratte. - Diss. Bonn (im Druck).

SUGA, S. & G. GUSTAFSON: Studies on the development of rat enamel by means of histochemistry, microradiography and polarized light microscopy. - Proc. 9th ORCA Congress, 223 - 244 (1963).

SZIZA, M. & L. PODHARGYAI: Toxikologische Untersuchung einiger in der ungarischen Industrie zur Anwendung gelangter arancetischer Amidoverbindungen. - Intern. Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg. 15, 447 - 456 (1957).

TAKEMATSU, T., N. ICHIZEN, N. ONODERA & I. KINUTA: Protection of corps against thiolcarbonate herbicides ba amines and anilines. - Japan Koka: 7606, 727 (1976).

TERMINE, J.D. & A.S. POSNER: Amorphous/crystalline interrelationship in bone mineral. - Calc. Tiss. Res. 1, 8 - 23 (1967).

TODA, Y. & G. van HUYSEN: Fluoride and the calcification of the rat incisor. - J. Dent. Res. , 1567 (1966).

TREON, J.F.: Physiological properties of selected non ionic surfactants. - Soap Perfum Cosmet. 38, 47 - 54 (1965).

ULLMANN: Encyklopädie der technischen Chemie. - Bd. 12, S. 38, Urban & Schwarzenberg: München-Berlin (1960).

WADDEL, W.-J.: A molecular mechanism for biological calcification. - Biochem. Biophys. Res. Comm. 49, 127 - 132 (1972).

WALLACH, D.P., K.H. & N.B. MARSHALL: Purification and properties of a Tween hydrolyzing enzyme from rat adipose tissue. - Biochim. Biophys. Acta 59, 690 - 699 (1962).

WASSERMANN, R.H.: Calcium transport by the intestine: A model and comment on vitamin D action. - Calc. Tiss. Res. 2, 301 - 313 (1968).

WATSON, M.L. & J.K. AVERY: The development of the hamster lower incisor as observed by electron microscopy. - Amer. J. Anat. 95, 109 - 161 (1954).

WEAST, R.C.: Handbook of Chemistry and Physics, 58. Aufl., CRC-Press: Cleveland,Ohio (1977-1978).

WEINMANN, J.P.: The effect of strontium on the incisor of the rat. - J. Dent. Res. 21, 497 - 504 (1942).

WERNER, H.W., J.L. MITCHELL, L.W. MILLER & W.F. von OETTINGEN: The acute toxicity of vapors of several monoalkx ethers of Ethylenglycol. - J. Ind. Hyg. Toxicol. 25, 157 - 163 (1943).

WILEY, F.H., W.C. HUEPER, D.S. BERGEN & F.R. BLOOD: The formation of oxalic acid from Ethylenglycol and related solvents. - J. Ind. Hyg. Toxicol. 20, 267 - 272 (1938).

WIDDOWSON: Zit. in Hagemann, E.: Ratte und Maus. Versuchstiere in der Forschung. - de Gruyter: Berlin (1960).

WOLBACH, S.B. & P.R. HOWE: The incisor teeth of albino rats and guinea pigs in vitamin A deficiency and repair. - Amer. J. Path. 9, 275 - 294 (1933).

WYNN, W., F. HALDI, K.D. BENTLEY & M.L. LAW: Dental caries in the albino rat in relation to the chemical composition of the teeth and of the diet. III. Composition of incisor teeth of animals fed diets with different Ca/P rations. - J. Nutr. 63, 57 - 64 (1957).

YAEGER, J.A.: Microscopy of the response of rodent dentin to injected fluoride. - Anat. Rec. 145, 139 - 147 (1963).

YAEGER, J.A.: Recovery of rat incisor dentin from abnormal mineralization produced by strontium and fluoride. - Anat. Rec. 154, 661 - 674, März 1966.

YOUNG, E.G. & L.B. WOOLNER: A case of fatal poisoning from 2-Methoxyäthanol. - J. Ind. Hyg. Toxicol. 28, 267 - 268 (1946).

ZISKIN, D.E., E. APPLEBAUM & T.N. SALMON: Effect on sceletal and dental development of rats thyro-parathyroidectomized at birth. - J. Dent. Res. 18, 251 - 252 (1939).

ZSOLNA, T.: Neuere Antimykotika. - Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 237, 548 - 558 (1977).

Verzeichnis der benutzten Abkürzungen

EDTA = Äthylendiamintetraacetat

EGTA = Äthylenglykol-bis-aminoäthyl-äther-V-N-tetraacetat

MOÄ = 2-Methoxyäthanol

TCA = 2,3,5,6-Tetrachloranilin

T80 = Tween-80

Herrn Prof. Dr. O. Hockwin danke ich für die Stellung des Themas.

Herrn Prof. Dr. H.R. Koch sei besonders gedankt für seine unermüdliche Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche, bei der Zusammenstellung und Durchsicht der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. E. Sauerwein danke ich für seine Hilfe bei der Begutachtung der histologischen Präparate und der Interpretation der Nagezahnuntersuchungen.

Meinem Bruder Bernhard bin ich für seine Bemühungen bei den Calciumbestimmungen verpflichtet.

Weiterhin danke ich für wohlwollendes Interesse und großzügige Unterstützung Prof. Dr. N. Liappis sowie Dr. F. Deerberg.

Lebenslauf

Geboren wurde ich am 11.3.1953 in Mayschoß. Meine Eltern sind Hermann Josef Josten und Gisela Josten, geb. Baltes.
Ich besuchte von 1957 an die Volksschule in Mayschoß und anschließend die Mittelpunktschule in Dernau, wo ich 1967 mein Hauptabschulzeugnis erhielt. Anschließend besuchte ich sechs Jahre lang das Aufbaugymnasium in Bad Neuenahr und erlangte dort 1973 das Zeugnis der Reife. Im Herbst des gleichen Jahres begann ich das Studium der Zahnmedizin an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn. Nach 2 Semestern legte ich 1974 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und nach weiteren 3 Semestern - 1976 - die zahnärztliche Vorprüfung ab. Die zahnärztliche Prüfung beendete mein Studium im Dezember 1978.
Nach Ableistung einer 2-jährigen Ausbildungszeit als wehrpflichtiger Stabsarzt bei der Bundeswehr und Assistenzarzt in einer zahnärztlichen Praxis beabsichtige ich, im Verlaufe des kommenden Jahres eine Zahnarztpraxis zu gründen.
Mit meiner Frau Ruth Josten, geb. Skolaster bin ich seit November 1976 verheiratet.